



Escola Politècnica Superior
d'Enginyeria de Vilanova i la Geltrú

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

PROJECTE FI DE CARRERA

**TÍTOL: ESTUDIO DEL LICOPENO DEL TOMATE COMO COLORANTE
NATURAL DESDE LA PERSPECTIVA ANALÍTICA E INDUSTRIAL**

**AUTORES: GEMMA ARÀNDIGA MARTÍ
SONIA DÍAZ SÁNCHEZ**

TITULACIÓ: INGENIERÍA TÉCNICA INDUSTRIAL (QUÍMICA INDUSTRIAL)

DIRECTORA: EMILIA PAPIOL VERA

DEPARTAMENT: INGENIERÍA QUÍMICA

DATA: JUNIO DE 2008

**TÍTOL: ESTUDIO DEL LICOPENO DEL TOMATE COMO COLORANTE
NATURAL DESDE LA PERSPECTIVA ANALÍTICA E INDUSTRIAL**

**COGNOMS: ARÀNDIGA MARTÍ
DÍAZ SÁNCHEZ**

**NOM: GEMMA
SONIA**

TITULACIÓ: INGENIERÍA TÉCNICA INDUSTRIAL

ESPECIALITAT: QUÍMICA INDUSTRIAL

PLA: 92

DIRECTORA: EMILIA PAPIOL VERA

DEPARTAMENT: INGENIERÍA QUÍMICA

QUALIFICACIÓ DEL PFC

TRIBUNAL

PRESIDENT

SECRETARI

VOCAL

DATA DE LECTURA:

Aquest Projecte té en compte aspectes mediambientals: ☐ Sí ☐ No

PROJECTE FI DE CARRERA

RESUM (màxim 50 línies)

El color es una de tantas variables y atributos que posee un alimento, pero nos pareció sorprendente cómo afecta a la hora de elegir un producto u otro ya que el primer contacto con cualquier objeto es casi siempre visual.

Hoy en día se usan mucho los colorantes, tanto para dar color como para dar propiedades de éste al alimento o producto, también se utiliza para las industrias farmacéuticas, cosméticas y de alimentos.

Un colorante puede ser tanto un tinte como un pigmento dependiendo del medio en el que se usa, aunque es muy difícil describir una distinción válida entre tintes y pigmentos.

Los carotenoides son colorantes de origen natural y se clasifican en dos grandes grupos, los carotenos y las xantofilas.

Dentro de los carotenos se encuentra el licopeno, es un pigmento vegetal, soluble en grasas, que aporta el color rojo característico a los tomates, sandías y en menor cantidad a otras frutas y verduras.

Posee propiedades antioxidantes, prevención de enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer, osteoporosis, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas...

En el proceso experimental se realiza la extracción, cuantificación, identificación y aplicación del licopeno presente en diferentes tipos de tomates y productos del tomate.

En todos los procesos realizados en el laboratorio, se debe tener en cuenta que el licopeno se degrada fácilmente, se oxida, hay que trabajar rápido y bien. Es conveniente protegerlo de la luz lo máximo posible, y evitar el contacto con el oxígeno en la medida en que se pueda.

Para la identificación del licopeno se usa la cromatografía de capa fina (TLC). Para la cuantificación se usa el espectrofotómetro, con una recta de calibrado a partir de un patrón.

Por último, damos una pincelada a lo que podría ser la instalación de una planta piloto a partir de la extracción con fluidos supercríticos, en este caso CO₂ que es considerado un gas limpio, inocuo, renovable y reciclable con el que se pueden realizar además otras aplicaciones.

Las ventajas de la extracción supercrítica (ESC) respecto a otros procesos convencionales como la extracción con solventes es la seguridad en las operaciones debido al uso de solventes no orgánicos y el uso de temperatura moderada en el rango crítico favorable para no llegar hasta su descomposición. La principal ventaja de los FSC es la excelente calidad del producto resultante.

Paraules clau (màxim 10):

Licopeno	Extracción	Colorante	Cromatografía
Supercríticos	Carotenoides		

AGRADECIMIENTOS

Particularmente queremos agradecer la labor docente, anónima y desinteresada que ofrecen aquellas personas que derrochan conocimiento y nos invitan a cruzar la puerta del saber por la que nos asomamos tímidamente.

Ellos son (por orden de lejanía): Eliana María Cardona (Colombia) donde la distancia se salva con un click. George Britton (Gran Bretaña), gurú y padre de los carotenoides, que nos ofreció la chispa que arrancó nuestra bujía. Guillermo Sta-María (Madrid) que quiso mantenerse en el anonimato pero no le dejamos. Jaume Torres y Sonia Guri (Barcelona) por su desinteresado tiempo y su explicación “in situ” de sus investigaciones.

No puedo por menos que interrogarme
por los pigmentos de los invidentes
¿cómo son sus colores? ¿cómo su realidad?
¿su blanco? ¿su negro?
siempre el mismo color ¿pero cuál?....
acaso tuviera razón Henri Matisse cuando dijo que
"El color debe ser pensado, soñado, imaginado".
Entre tanto, pintemos todos de color el mundo:
de amor, de inventos, de presencias, de poemas, risas y juegos....

Rojos, color muy intenso,
de la vida, la pasión, del amor,
de lo prohibido, y la precaución,
del fuego que mora en todos.
Aunque irónica a veces es la vida,
los colores reflejos son,
de distintas intensidades de lo mismo,
"ondas" captadas por la retina.
A los que viven entre extremos,
no se pierdan los colores,
desacelerando, observando y viviendo,
a estos, y a sus matices diversos.

Javier R. Cinacchi

1. OBJETIVO	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. HISTORIA DE LOS COLORANTES	7
4. EL COLOR.....	9
4.1. La luz visible	11
4.1.1. Funcionamiento del ojo humano	11
4.2. Importancia del color en la percepción del ser humano	11
4.3. Medida del color en los alimentos.....	13
4.3.1. Fundamentos de colorimetría	14
4.4. Aplicaciones del color en la tecnología de alimentos	15
5. COLORANTES.....	16
5.1. Clasificación general de los colorantes	17
5.1.1. Clasificación de los colorantes alimentarios	18
6. CAROTENOIDES	20
6.1. Clasificación de los carotenoides	21
6.2. Características de los carotenoides	21
6.3. Propiedades	25
6.3.1. Propiedades físico-químicas	26
6.3.2. Propiedades fisiológicas	28
6.3.3. Propiedades metabólicas y genéticas.....	29
6.3.4. Factores que influyen en su composición.....	34
6.4. Licopeno	36
6.4.1. Propiedades químicas del licopeno.....	37
6.4.2. Absorción, transporte y metabolismo del licopeno.	38

6.4.3.	Beneficios para la salud.....	40
7.	EXTRACCIÓN DEL LICOPENO DEL TOMATE.....	41
7.1.	Fundamento teórico, aislamiento de pigmentos	41
7.1.1.	Técnicas de extracción	41
7.1.2.	Cromatografía de capa fina (TLC)	42
7.2.	Parte experimental	45
7.2.1.	Diagrama de bloques: obtención y análisis del licopeno.....	45
7.2.2.	Material utilizado:	46
7.2.3.	Reactivos utilizados.....	46
7.2.4.	Pasos previos	47
7.2.5.	Procedimiento.....	47
7.2.6.	Cálculos y resultados.....	60
7.2.7.	Errores cometidos.....	68
7.2.8.	Aplicación del licopeno.....	68
7.2.9.	Seguridad en el laboratorio.....	70
7.3.	Presupuesto	72
8.	INTERÉS INDUSTRIAL.....	73
8.1.	Extracción con fluidos supercríticos.....	74
8.2.	Fundamento de la extracción.....	75
8.2.1.	Condiciones de operación de los fluidos supercríticos.....	75
8.2.2.	Planta de extracción.....	78
8.2.3.	Procesos de extracción	79
8.3.	El dióxido de carbono como fluido supercrítico	80
8.3.1.	Características y propiedades	80
8.3.2.	El CO ₂ supercrítico: propiedades como disolvente	80

8.3.3.	Ventajas e inconvenientes del CO ₂ en la extracción supercrítica.....	81
8.4.	Aplicaciones comerciales de la extracción supercrítica	82
8.5.	Planta extractora de licopeno.....	82
8.5.1.	Funcionamiento y puesta en marcha	83
8.5.2.	Ventajas de la planta.....	85
9.	NORMATIVA Y LEGISLACIÓN.....	86
10.	PERSPECTIVA DE FUTURO.....	88
10.1.	Últimas novedades, noticias, investigaciones... ..	88
11.	CONCLUSIONES.....	93
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
13.	GLOSARIO.....	100
14.	ANEXOS.....	103

1. OBJETIVO

El objetivo de este proyecto pretende dar a conocer el interés por la coloración de los objetos, especialmente por los productos alimentarios, ya que éstos, debido a sus manipulaciones desde que se cosechan o se fabrican, hasta que llegan al consumidor, han pasado por muchos procesos en los cuales pueden perder varias de sus propiedades, entre ellas, el color.

El color es una de tantas variables y atributos que posee un alimento, pero nos pareció sorprendente cómo afecta a la hora de elegir un producto u otro ya que el primer contacto con cualquier objeto es casi siempre visual.

Por otro lado, la industria del color en cualquier ámbito nos parecía que ya había abusado del uso de coloración sintética con el único fin de atraer al consumidor por un aspecto que no correspondía a la calidad ofrecida.

Nuestro interés se ciñe entonces en cómo ofrecer esa coloración de manera natural, de aspecto agradable y además ofrecer unas propiedades nutritivas añadidas, y que a la vez fuera factible su estudio analítico como elemento químico y su producción a escala industrial.

La elección fue clara: un colorante proveniente de fuentes naturales como materia prima, en este caso de origen vegetal, entre otros, el licopeno. El licopeno se encuentra clasificado dentro de la extensa familia de los carotenoides y su principal fuente es el tomate.

El auge de esta molécula de moderada complejidad nos ha llevado a realizar un extenso y exhaustivo estudio bibliográfico poniéndonos en contacto con personas conocedoras y expertas en la materia. A la vez nos hemos atrevido a adentrarnos en su análisis, extracción e identificación con cromatografía de capa fina a escala de laboratorio para darnos cuenta de la complejidad que tiene el trato de una molécula a la que debemos atender como “un ser vivo”. Nos quedaría realizar su estudio más profundo con cromatografía líquida de alta resolución; aquí dejamos la llave y la puerta abierta para aquéllos que quieran seguir en esta línea de investigación.

Por último, damos una pincelada a lo que podría ser la instalación de una planta piloto a partir de la extracción con fluidos supercríticos, en este caso CO₂ que es considerado un gas limpio, inocuo, renovable y reciclable con el que se pueden realizar además otras aplicaciones.

2. INTRODUCCIÓN

De los cinco sentidos, la vista es uno de los más desarrollados e importantes para los humanos. Usamos nuestra capacidad para ver en casi cada aspecto de nuestras vidas diarias, y continuamente nos proporciona información sobre nuestro entorno. El color añade otra dimensión que nos da datos adicionales así como la suma de nuestro goce y disfrute. No es sorprendente, además que desde tiempos remotos, los alimentos se hayan preparado para ser visualmente más apetitosos a partir del uso de ingredientes coloreados.

Los colorantes son aditivos, sustancias que adicionadas a los alimentos proporcionan, refuerzan o varían su color, ya sea porque el alimento ha perdido su color en el tratamiento industrial o bien por hacerlo más agradable a la vista y más apetitoso.

Los aditivos alimentarios se definen como aquellas sustancias que se añaden intencionadamente a los alimentos y bebidas sin el propósito de cambiar su valor nutritivo, con la finalidad de modificar su caracteres, sus técnicas de elaboración y para mejorar su adaptación al uso a que van destinados.

Los aditivos alimentarios siguen siendo el tema que más se desconoce dentro de la alimentación y que preocupa más a los consumidores. Aunque se asocian a los tiempos modernos, los aditivos alimentarios llevan siglos utilizándose.

Un aditivo de color es cualquier tinte, pigmento o sustancia que pueda repartir color al ser aplicado a un alimento, droga, cosmético o al cuerpo humano.

Los aditivos de color se usan en alimentos por muchas razones, inclusive para compensar la pérdida de los colores que se produce por la exposición a la luz, aire, temperaturas extremas, humedad y condiciones de almacenamiento, para corregir las variaciones naturales del color de algunos alimentos, para realzar los colores naturales y para proporcionar color a alimentos que carecen de color [14].

El color es la primera sensación que se percibe de un alimento, y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Es también un factor importante dentro del conjunto de sensaciones que aporta el alimento, y tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor. Es posible, por ejemplo, confundir a un grupo de catadores, coloreando productos como los helados con un color que no corresponda con el del aroma utilizado. Los alimentos naturales tienen su propio color, por lo que en principio parecería como ideal su mantenimiento a lo largo del proceso de transformación. Sin embargo, los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe entre los diferentes lotes de fabricación de un producto.

Si bien es cierto que el empleo de aditivos de forma descontrolada podrá ocasionar algún problema sanitario y de salud pública, no es menos cierto que gran parte de los productos alimenticios que consumimos hoy en día no podrían existir sin el empleo de estos compuestos [65].

3. HISTORIA DE LOS COLORANTES

Desde las primeras civilizaciones el hombre usó materias colorantes naturales. Estas materias eran empleadas para teñir ropas, pintar las pieles y fabricar objetos religiosos y decorativos. Los pigmentos o sustancias coloreadas se extraían de plantas, animales y minerales.

En China se encontraron registros de la utilización de colorantes en 2600 antes de Cristo. Más adelante romanos encontraron tumbas con textiles teñidos de índigo que substituyo al púrpura imperial. Papiros encontrados en tumbas contienen la receta conocida más antigua del tinte. Los egipcios empleaban los colorantes naturales para realzar el atractivo de algunos alimentos y los romanos el salitre y los derivados de azufre como conservantes [23].

Las sustancias vegetales más empleadas en las primeras civilizaciones eran: palo de campeche, cúrcuma, índigo natural. De animales se empleaba la cochinilla.

En 1507 Francia, Holanda y Alemania empezaron el cultivo de plantas de tinte como industria.

El primer colorante obtenido fue el ácido pícrico, preparado por Woulfe en 1771, mediante la acción del ácido nítrico sobre el índigo natural.



Figura 2.1.
Friedrich
Ferdinand
Runge

Durante la primera mitad del siglo XIX se descubrieron colorantes orgánicos artificiales de una forma casual. El fundamento decisivo para el desarrollo de la química moderna de colorantes fue el descubrimiento del fenol y de la anilina en el alquitrán de hulla por el químico alemán Friedrich Ferdinand Runge (figura 2.1.) en el 1834. Logró aislar la anilina y mediante la oxidación extrajo de ésta el negro anilina.

Aproximadamente 20 años más tarde, un estudiante de 18 años de edad, William Henry Perkin (figura 2.2.), hizo en Londres otro descubrimiento casual. En realidad pretendía obtener quinina mediante la oxidación de anilina, una sustancia muy difundida por aquella época y que se utilizaba para bajar la fiebre y sobre todo para combatir la malaria. En 1856 obtuvo, durante la oxidación de anilina impura, un masa negro-violeta a partir de la cual pudo aislar mediante la extracción con alcohol un colorante violeta, al que denominó mauveína o anilina púrpura.



Figura 2.2.
William Henry
Perkin

La mauveína de Perkin fue el primer colorante industrial generado de forma sintética y que tras la coloración proporcionaba tejidos luminosos y coloreados de forma duradera. Muy pronto, la mauveína llegó a ser muy popular. Y es que a partir de ese momento la moda ya no dependía únicamente de las materias primas proporcionadas por la naturaleza. Personas de referencia en cuestiones de estilo como la Emperatriz Eugenia de Francia se exhibieron en público con prendas de vestir coloreadas con la anilina púrpura e incluso la Reina Victoria de Inglaterra se presentó en 1862 en la Royal Exhibition con un vestido de seda de color violeta. Sin embargo, en la actualidad, la mauveína ya no tiene importancia alguna debido a su insuficiente resistencia a los ácidos y los álcalis.

Las civilizaciones antiguas creían en la influencia del color sobre los seres humanos. Tanto en China como en el antiguo Egipto y en la India se usaba la cromoterapia para curar diversas dolencias.

El color tuvo incidencia desde tiempos remotos, circunstancia que se expresaba y sintetizaba simbólicamente. Entre muchos ejemplos, en la antigua China los puntos cardinales eran representados por los colores azul, rojo, blanco y negro, reservando el amarillo para el centro. (Por tanto, el amarillo fue tradicionalmente el color del imperio chino).

De igual forma, los mayas de América central relacionaban Este, Sur, Oeste y Norte con los colores rojo, amarillo, negro y blanco respectivamente. En Europa los alquimistas relacionaban los colores con características de los materiales que utilizaban, por ejemplo rojo para el azufre, blanco para el mercurio y verde para ácidos o disolventes.

Uno de los primeros estudiosos que analizó las propiedades del color fue Aristóteles, quien describió los colores básicos relacionados con la tierra, el agua, el cielo y el fuego. En el siglo XIII Sir Roger Bacon registró sus observaciones sobre los colores de un prisma atravesado por la luz, atribuyendo el fenómeno a propiedades de la materia. Más tarde Leonardo da Vinci clasificó como colores básicos al amarillo, verde, azul y rojo de acuerdo con aquellas categorías de Aristóteles, agregando el blanco como receptor de todos los demás colores y el negro -la oscuridad- como su ausencia.

A comienzos del s. XVIII, Isaac Newton planteaba los fundamentos de la teoría lumínica del color, base del desarrollo científico posterior.

Sin embargo, el poeta y científico alemán Johann Wolfgang Von Goethe (figura 2.3.), se opuso a la visión meramente física de Newton, proponiendo que el color en realidad depende también de nuestra percepción, en la que se halla involucrado el cerebro y los mecanismos del sentido de la vista.



Figura 2.3.
Johann
Wolfgang Von
Goethe

4. EL COLOR

Los colores comunican, todos los días encontramos pruebas de esto. Nuestras vidas están llenas de color; los coches y casas son brillantes y coloridos, en la tienda de la esquina encontramos montañas de revistas satinadas y nuestras ropas también reflejan nuestros gustos por medio de los tintes brillantes con los que nos adornamos.

El color es un factor importante en nuestro mundo, tanto para transmitir señales de advertencia (semáforos, señales verticales, de peligro...) como para utilizarlo de herramienta para influir sutilmente en nuestras emociones. Un ejemplo es que muchas empresas utilizan el color azul como dominante porque se considera que el azul es relajante y que al mismo tiempo evoca una sensación de confianza [5].

El color también es la expresión de una cultura concreta. Los inuit, por ejemplo tienen 17 expresiones diferentes para el color blanco, puesto que deben ser capaces de diferenciarlo con términos precisos en el frío y blanco mundo polar. Por el contrario nosotros no entendemos estos matices del blanco, puesto que no los necesitamos.

Desde el punto de vista físico, el blanco no es un color, sino la suma de todos los colores en cuanto a pigmento, sería considerado un color primario, ya que no puede obtenerse a partir de ninguna mezcla. Por el contrario, el negro es la ausencia absoluta de la luz, y sería considerado un color secundario, ya que es posible obtenerlo a partir de la mezcla de otros. Estos dos colores junto al gris se consideran colores acromáticos, es decir, colores sin color.

Desde el punto de vista psicológico sí son colores puesto que originan en el observador determinadas sensaciones y reacciones.

De acuerdo con la teoría de Goethe, anteriormente citado, lo que vemos de un objeto no depende solamente de la materia; ni de la luz, sino que involucra también a una tercera condición que es nuestra percepción del objeto. Tal subjetividad radica en la misma base física del concepto de color, que es la percepción subjetiva de las distintas frecuencias de onda de luz, dentro del espectro visible, incidiendo sobre la materia. Goethe intentó deducir leyes de armonía del color, de qué forma nos afectan los colores y el fenómeno subjetivo de la visión. Analizó los efectos de los colores complementarios, deduciendo que es una sensación que no se origina en cuestiones físicas relativas a la incidencia lumínica sobre un objeto, sino por el funcionamiento de nuestro sistema visual. Desde el punto de vista de la teoría óptica algunas de las observaciones de Goethe han demostrado no estar tan erradas pero han permanecido desacreditadas durante mucho tiempo.

En la actualidad los colores funcionan a tres niveles:

- colores fisiológicos que influyen en nuestras emociones.
- colores físicos que expresan nuestros estados de ánimo.

- colores psicológicos que están dirigidos a alcanzar varios objetivos.

Los colores expresan estados anímicos y emociones de muy concreta significación psíquica, a la vez que existen terapias relacionadas con ellos. También ejercen acción fisiológica. Lo que es un hecho irrefutable es que la percepción del color es un concepto completamente individual. Y según la cultura y las diferentes religiones, les damos un significado u otro.

A pesar de todo, el estudio del color, hoy día, es un campo que está dirigido a analizar el efecto de éste en la percepción y la conducta humana aunque desde el punto de vista estrictamente médico, todavía es una ciencia inmadura.

Algunos de los significados más destacados se detallan a continuación:

El **amarillo** es el color que se relaciona con el sol y significa luz radiante, alegría y estímulo. Hace que las formas y objetos se vean más grandes y anchos. También se lo asocia a la precaución. En los negocios es preventivo en etiquetas y notas de seguridad, es efectivo para fondos de gráficos.

El **rojo** está relacionado con el fuego y sugiere calor y excitación. Tiene un efecto muy poderoso; atrae la atención visual inmediatamente. Estimula la acción. En los negocios se asocia con déficit y deuda y para identificar niveles críticos de suministros; en cartas y documentos cortos se usa para estimular al lector a actuar. Autoriza, estimula, dramatiza, compete; simboliza la pasión.

El **azul**, color del cielo y el agua, es serenidad, infinito y frialdad. Tiene un efecto calmante, relaja, refresca. Crea una imagen muy profesional tradicional en los negocios. En general se asocia con la seguridad fiscal y la fuerza. Se utiliza en estados de cuenta bancarios y depósitos, así como en pólizas de seguros. Produce sentimientos tranquilos y caprichos pacíficos.

El **naranja**, mezcla de amarillo y rojo, tiene las cualidades de éstos, aunque en menor grado. Es una opción para resaltar información en gráficos de barras y otros gráficos de negocios. En los negocios es efectivo usarlo en material promocional que busca dar una imagen brillante y alegre. Estimula apetitos, la conversación y la claridad.

El **verde**, color de los prados húmedos, es fresco, tranquilo y reconfortante. Se asocia con un aspecto natural, la fertilidad y la primavera. En los negocios se utiliza en boletines de inversiones, materiales de entrenamiento, etiquetas... anima el crecimiento emocional.

El **rosa** se le asocia características femeninas. En los negocios para facturas y estados financieros, suaviza los fuertes efectos del rojo sin llegar a perder impacto. Calma, consiente; promueve la afabilidad y el afecto.

El **violeta** es madurez, y en un matiz claro expresa delicadeza. Comodidades, espiritualidad; crea el misterio y saca la intuición.

Los colores expresan estados anímicos y emociones de muy concreta significación psíquica, también ejercen acción fisiológica. Lo que es un hecho irrefutable es que la percepción del color es un concepto completamente individual.

4.1. La luz visible

La luz es el agente que produce la sensación visual; sin ella no son visibles los cuerpos, ni pueden ser apreciadas sus cualidades tonales de modelado o volumen, ni tampoco la percepción de la profundidad.

Los rayos del sol están formados por una mezcla de luz con longitud de onda variable; desde la longitud de onda más corta, azul, hasta la longitud de onda mayor, que es el rojo. La luz se descompone en sus diferentes longitudes de onda a través de un prisma.

4.1.1. Funcionamiento del ojo humano

La visión en color es consecuencia de la naturaleza del mundo físico, una respuesta fisiológica de la retina a llegar la luz al ojo, y el procesamiento neurológico de esta respuesta retinal en el cerebro

La retina recibe una pequeña imagen invertida de ese mundo exterior, transmitida por el sistema óptico formado por la córnea y el cristalino. El ojo es así una pequeña “cámara oscura” que es capaz de adaptarse a distintos niveles de iluminación gracias a que el diafragma formado por el iris puede cambiar de diámetro, proporcionando una pupila de 2 mm a 8 mm de diámetro.

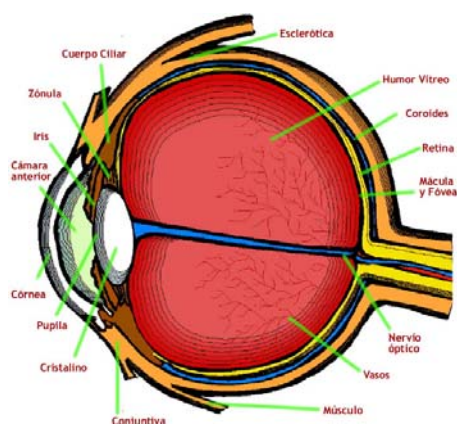


Figura 3.2. Partes del ojo

La retina traduce la señal luminosa en señales nerviosas. Está formada por tres capas de células nerviosas. Son células fotosensibles y se las conoce por conos y bastones situadas en la parte trasera de la retina. La luz debe atravesar antes las otras dos capas de células para estimularlas. Estas tres células fotosensibles detectan los tres colores primarios. Reconocen los colores rojo, verde y azul. Los demás colores son una mezcla de estos colores primarios que varían únicamente en la intensidad con la que cada color se utiliza en la mezcla. Los conos y bastones contienen pigmentos visuales, que absorben la luz dependiendo de la longitud de onda. Los conos son los

que proporcionan la visión en color (visión fotópica). Hay tres clases de conos (S, M y L) en función de las respuestas a la sensibilidad de las longitudes de onda cortas, medias y largas respectivamente. Cada uno de ellos contiene un pigmento fotosensible distinto.

4.2. Importancia del color en la percepción del ser humano

El color de un alimento es, en general, un factor determinante para su aceptabilidad. Este atributo, produce en el consumidor potencial la primera impresión de aceptación o rechazo. Una apariencia natural es bien admitida, mientras que se toman precauciones cuando un alimento muestra un color inesperado, interpretándolo como un posible signo de alteración, adulteración o mal procesamiento.

El simple aspecto externo crea en el consumidor expectativas de sabor y este primer contacto, es una parte esencial de la cadena de consumo, ya que a falta de otros elementos de juicio, éste va a determinar su destino. Inconscientemente asociamos colores a sabores y aromas, sin que tenga que existir necesariamente una relación causa efecto; por ejemplo, el color rosado en un alimento hace pensar en sabor dulzón, mientras que el verde se asocia a olores y sabores frescos y afrutados. Esa valoración subjetiva, y hasta cierto punto inconsciente, abre la puerta a todos los posteriores juicios sobre el alimento, los cuales permitirán conocer más fidedignamente sus virtudes y defectos.

Lo que importa es la sensación que produce la percepción del alimento en un determinado sujeto. En esa sensación final interviene un buen número de variables objetivas y subjetivas: forma, textura, entorno, transparencia, olor, etc.

Los humanos tenemos la experiencia del color de los alimentos bajo determinadas condiciones que nos son familiares. Por el color percibido somos capaces de predecir su sabor, agradable o no, y de decidir aceptarlos o rechazarlos. Por otra parte, los conocimientos sobre visión humana indican que el color es un parámetro sensible (buena discriminación) y fiable (constancia del color) para identificar objetos.

En la naturaleza, existen algunos tonos que se repiten con bastante frecuencia, como por ejemplo el verde, rojo, naranja y amarillo. El azul-verdoso es raro y el azul prácticamente no existe. Algunos de estos colores han evolucionado independientemente del hombre, otros lo han hecho con él. En cualquier caso, el hombre se ha adaptado a este hecho, de forma que el código del color le sirve para saber de una manera rápida y segura si un alimento es comestible o no.

Estos argumentos justifican el uso, cada vez más difundido, del color como parámetro de selección y control de calidad para alimentos. Sin embargo, al medir el color de alimentos hay que tomar en consideración muchos factores que, de no ser tratados adecuadamente, darán lugar a graves errores en la medida, con lo cual pueden obtenerse resultados muy distintos al medir un mismo producto. El mayor problema es que los alimentos pueden presentarse con formas físicas muy diferentes. El tomate, por ejemplo, puede ser hortaliza, zumo, pasta o salsa. Además sufren transformaciones con el tiempo: maduración, fermentación, cambios de pH, etc. En definitiva, cada alimento tiene sus particularidades y ha de ser considerado individualmente.

A menudo oímos hablar de la energía que contienen los alimentos, de su potencial alimenticio, de sus mezclas positivas y negativas, de sus propiedades negativas y curativas.

Pero en los mismos alimentos hay algo más que proteínas, minerales y vitaminas, que son los colores y las formas.

Algunos colores relacionados con los alimentos son los siguientes:

- El color **violeta** se encuentra especialmente en las verduras, los rábanos, la remolacha, las cebollas, estas son ricas en magnesio y sales minerales, no agradan a todas las personas porque sus sabores son intensos y



demasiados aromáticos.

- El color **azul** fuera de algunos tipos de algas o postres pintados, no existen alimentos de ese color, quizás porque la naturaleza sabía que en su economía alimentaría los colores violeta y azul intenso resultan algo nauseabundos a los comensales.
- El color **verde** en los alimentos es fuente de salud, de vida regenerativa y crecimiento.
- El color **amarillo** en los alimentos resulta también atractivo, su equilibrado punto eléctrico les hace magníficos depuradores, y buenos fijadores de las propiedades alimenticias.
- El color **naranja** en los alimentos se presenta principalmente en las frutas y tiene virtudes rejuvenecedoras.
- En los alimentos desde el color **rosa** hasta el color **salmón**, pasando por las distintas gamas de **rojo**, los alimentos que ostentan dichos tonos son los más atractivos para el ser humano.
- El color **marrón** en los alimentos son afrodisíacos, estimulantes, y mantienen abierto el apetito.
- Los alimentos blancos suelen ser muy completos, muy nutritivos, incluyendo las vísceras, los mariscos, y los pescados de carne blanca.



4.3. Medida del color en los alimentos

Un aspecto importante y básico es la medida del color de los alimentos. Su estudio está tomando una gran importancia en la industria de los alimentos debido a que se está usando como herramienta para la automatización y control de procesos de la elaboración de diversos productos y en el control de calidad del producto acabado.

La medida del color se puede realizar por métodos objetivos y subjetivos.

Una forma de realizar dicha medida de manera subjetiva es mediante inspección visual. En el campo de la tecnología de alimentos, la observación visual de muestras para la especificación del color suele ser, en general inadecuada. Las razones de este hecho son varias: fatiga visual, sobre todo si se tiene que realizar de manera sistemática, dificultad para conseguir una iluminación uniforme y un entorno apropiado, pobre memoria del color, dificultad para establecer un gradiente que además resulta fatigoso y consume mucho tiempo.

De los métodos objetivos, el sistema CIELAB, explicado a continuación, es el que más se aproxima a la apreciación visual humana, y ha sido recomendado por diversas sociedades científicas para su uso en las mediciones del color en los alimentos, siendo adoptado como Norma UNE. De cualquier forma, cada alimento tiene sus propiedades físicas y existen

variedad de formas, texturas, consistencias, uniformidades, etc. que a diferencia de otras áreas industriales como papel, textil y plástico son superficies en general planas y uniformes.

El color en los alimentos depende fundamentalmente de las transformaciones que tienen lugar sobre los pigmentos propios o adicionados a los alimentos.

4.3.1. Fundamentos de colorimetría

La comisión internacional de la iluminación (CIE), experimentando con muchas personas encontró la curva del observador medio patrón para definir un observador estándar concreto, denominado observador colorimétrico estándar CIE 1931 al que suele llamarse observador de 2°. La CIE estableció un procedimiento oficial para las igualaciones o correspondencias de color a partir de tres curvas: \bar{x} , \bar{y} , \bar{z} .

El espacio formado por los ejes x y z se puede considerar un espacio tridimensional. En ese espacio cualquier color se representa con un punto concreto y el conjunto de todos los puntos forma un sólido tridimensional que es el espacio del triestímulo XYZ.

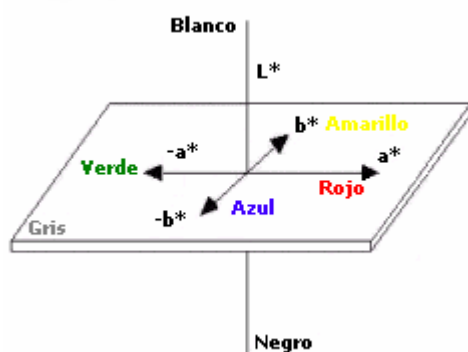


Figura 3. 1 Espacio de color CIELAB

El espacio CIELAB (lo propuso la CIE en 1976 como aproximación a un espacio de color uniforme) es una transformación matemática del espacio x y z en el cual se fija un blanco de referencia. Ese blanco de referencia puede ser, por ejemplo una fuente luminosa, el iluminante al que se haya adaptado el observador [14].

Los tres ejes del sistema CIELAB se indican con los nombres $L^*a^*b^*$. Representan Luminosidad (L^*), tonalidad de rojo a verde (a^*) y tonalidad de amarillo a azul (b^*).

El color puede ser evaluado por el índice IC^* obtenido de la siguiente expresión:

$$IC^* = \frac{a \cdot 1000}{L \cdot b}$$

El IC^* por sus características de variación puede utilizarse como variable de control de la calidad organoléptica de alimentos.

Para especificar exactamente un color necesitamos un mínimo de parámetros que los defina, éstos se conocen como trivarianza visual. Los tres atributos a los que hace referencia un color son [63]:

- Tono: podríamos hablar del color en sí mismo, se trata de la longitud de onda dominante del color y la cualidad que lo distingue de los demás. Es decir, es la primera respuesta que se da cuando se pregunta por el color de un objeto.

- Claridad: cada color tiene su claridad específica, se trata de si un color es muy luminoso o no, si el tipo de color es claro u oscuro.
- Saturación: nos indica la cantidad de color presente, su pureza. Es la cantidad de blanco que tiene un color. Contra más saturado, el color es más intenso y puro, y contiene menos blanco.

Los tintes son solubles en la materia a la que se aplican. Tienden a absorber la luz y no a dispersarla.

Los pigmentos son insolubles en el medio al que se aplican, absorben y dispersan la luz.

4.4. Aplicaciones del color en la tecnología de alimentos

El color, como aditivo, y como se ha comentado, es el principal atributo de calidad que tiene el consumidor a la hora de seleccionar los alimentos ya que puede producir la aceptación o rechazo de éstos por parte del consumidor. Esta incidencia tiene lugar en áreas muy diferentes que abarcan todos los procesos de selección, elaboración y consumo, desde el empaquetado del producto hasta la presentación de los platos, pasando por la selección y manipulación industrial o la selección y compra por parte del consumidor.

Hay tres motivos principales que justifican el uso de aditivos para cambiar o restaurar el color de los alimentos [25].

Primero: resulta más agradable si el alimento que comemos tiene el color apropiado.

Segundo: los colorantes se adicionan por numerosas razones de fabricación, tales como restaurar el color deteriorado por el proceso de elaboración, asegurar la uniformidad del color del producto, intensificar el color de alimentos manufacturados tales como bebidas refrescantes o salsas, para servir de indicativo de la calidad del producto, etc.

Tercero: para sustituir productos naturales mucho más caros de obtener.

Este campo involucra en algunos casos problemas éticos que también deben ponerse de manifiesto como es el caso de utilizar colorante amarillo en la fabricación de bollería con objeto de dar la sensación de mayor contenido en huevo, o determinados colorantes en la elaboración de zumos con el mismo objetivo.

5. COLORANTES

Un colorante es cualquier sustancia que imparte color a otro material o mezcla; a la vez, cambia el color de la luz que refleja como resultado de la absorción selectiva del color.

Un colorante debe tener una alta fuerza teñidora relativa a los materiales que colorea. Además debe ser estable en forma sólida a temperatura ambiente. Este proceso físico es diferente a la fluorescencia y otras formas de luminiscencia, en las cuales el propio material emite luz.

Los colorantes son utilizados para teñir pintura, tinta, plástico, textiles, cosméticos, alimentos y otros productos. La mayoría de los colorantes utilizados en la manufactura y en las artes visuales son colorantes secos, usualmente en forma de polvo fino. Este polvo es añadido a un vehículo o matriz, un material relativamente neutro o incoloro que actúa como adhesivo. Para aplicaciones industriales, así como artísticas, la permanencia y la estabilidad son propiedades deseadas. Los colorantes que no son permanentes son llamados fugitivos. Los colorantes fugitivos se desvanecen con el tiempo, o con la exposición a la luz, mientras que otros terminan por ennegrecer.

Los instrumentos para medición que comparan e igualan el tono, claridad y saturación de los colores se llaman colorímetros.

Un colorante puede ser tanto un tinte como un pigmento dependiendo del medio en el que se usa, aunque es muy difícil describir una distinción válida entre tintes y pigmentos. Algunos la tienen establecida sobre la base de su solubilidad, otros sobre la forma física y método de aplicación. Se dice que el pigmento, es insoluble en el medio a utilizar (formando una suspensión), y un tinte, el cual o es un líquido o es soluble en la materia (resultando en una solución).

Así la mayoría de pigmentos son polvos secos insolubles y el efecto colorante es un resultado de su dispersión en un sólido o líquido.

La mayoría de los tintes, por otro lado, son productos orgánicos sintéticos solubles que están químicamente unidos a (y realmente se vuelven parte de) la materia que se aplican. Los tintes orgánicos son, generalmente, brillantes y más variados que los pigmentos, pero tienden a ser menos estables al calor, luz del sol y efectos químicos. El término colorante se aplica al negro y blanco tanto como a los colores reales.

Un pigmento es cualquier sustancia, generalmente en forma de polvo seco, que da color a una sustancia o a una mezcla. La mayoría de pigmentos son insolubles en disolventes orgánicos y agua; son excepciones los pigmentos orgánicos naturales como clorofila, que son organosolubles generalmente. Para tener el calificativo de pigmento, un material debe tener un valor colorante positivo [31].

Algunos de estos pigmentos pueden sintetizarse químicamente. Su uso como colorantes textiles y productos farmacéuticos va en aumento.

En cuanto a la toxicidad de los colorantes, desde hace años se han mirado como agentes potencialmente tóxicos. En la actualidad no son peligrosos debido al conocimiento y al control que de ellos se tiene.

Normalmente la toxicidad de un colorante está relacionada con su absorción. El grado de seguridad requerido, depende de los campos de aplicación y frecuencia del uso. No es lo mismo, la toxicidad de un colorante, utilizado en jabones, cremas y otros productos aplicados en la superficie corporal, que aquélla que se pueda producir cuando el colorante es ingerido en medicamentos o alimentos. (*Véase capítulo 10. Normativa y legislación*).

Se observa a nivel internacional una tendencia cada vez mayor a utilizar colorantes naturales.



Figura 5-1. Colorantes a la venta en un mercado

Los colorantes se comercializan por lo general en forma de mezcla de polvo seco que contienen una o varias sustancias colorantes. Como el suministro de los colorantes es seco, se economizan costos de transporte y se garantiza una mejor conservación de productos. También pueden ser suministrados en forma de soluciones. La apariencia externa de un colorante no es un criterio para su calidad o intensidad, ya que puede variar en función de la temperatura, pH, humedad, etc. Los colorantes son muy sensibles a las influencias ambientales del aire, luz, temperatura excesiva. Con el oxígeno del aire puede producirse una oxidación, lo que puede ocurrir también con la luz. Por todo esto los colorantes deben ser almacenados en lugares fríos y secos.

Para evitar descomposiciones de carácter microbiológico se suele recurrir a la pasteurización, a la adición de sal o sustancias conservantes.

5.1. Clasificación general de los colorantes

Un colorante puede encontrarse de tres modos:

1. Naturalmente presente en un material (clorofila en la vegetación)
2. Mezclado con él mecánicamente (pigmentos secos en pinturas)
3. Aplicado a él en una solución (tintes orgánicos para fibras)

Los pigmentos pueden a su vez clasificarse en:

1. Inorgánicos

- Óxidos metálicos (hierro, titanio, zinc, cobalto y cromo)
- Suspensiones de metales en polvo (oro, aluminio)
- Colores térreos (sienas, ocre, sombras)
- Cromatos de plomo
- Negro de carbón

2. Orgánicos

- Animales (rodopsina, melanina)
- Vegetales (clorofila, xantofila, índigo, flacona, caroteno)

Un pigmento vegetal es un colorante natural producido por las plantas, con excepción de hongos y líquenes. Pueden clasificarse en tres grupos;

1. Las clorofilas (tipos a, b y c): color verde. Son porfirinas que contienen magnesio y técnicamente se consideran ceras microcristalinas.

2. Los carotenoides: colores amarillo y naranja-rojo:

- Caroteno (hidrocarburos de cadena recta)
- Xantofila (hidrocarburos de cadena recta que contienen dos moléculas de oxígeno)

3. Los flavonoides: colores rojo, amarillo, azul, naranja, marfil. Son compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno:

- Catequizas
- Flavonas, flavanoles, antocianinas
- Flavonoles
- Sintético (ftalocianina, litoles, toluidina, rojo para, matizadores, las, etc.)

5.1.1. Clasificación de los colorantes alimentarios

Las fórmulas químicas de los colorantes alimentarios suelen ser muy diferentes y es difícil encontrar una clasificación adecuada, pero se pueden clasificar por lo general en dos grandes grupos:

1. Naturales, que son de origen animal, vegetal o incluso mineral
2. Sintéticos o artificiales que son elaborados químicamente

En la Unión Europea se identifican por la letra E y sus códigos están entre el E-100 y el E-181. [Véase Anexo I].

6. CAROTENOIDES

Los carotenoides son colorantes de orígenes naturales muy extendidos, no sólo en las plantas sino también en las bacterias, hongos, levaduras, algas y animales invertebrados. Se encuentran universalmente en los cloroplastos de todas las plantas y algas superiores.

Los carotenoides se encuentran en todos los alimentos de origen vegetal. En general, mientras mayor sea la intensidad del color, mayor será el contenido de carotenoides.

Como las plantas son capaces de sintetizar carotenoides de nuevo, la composición de las plantas se enriquece con la presencia de pequeñas cantidades de precursores biosintéticos, junto con los derivados de los componentes principales. Los animales son incapaces de biosintetizar carotenoides, así que éstos son derivados de la dieta, absorbidos selectivamente o no, y acumulados de forma que no cambian o si lo hacen, se modifican ligeramente en carotenoides típicos animales.

Los carotenoides son tetraterpenoides (terpenoides con 40 átomos de carbono). En las primeras fases de la biosíntesis de carotenoides, el primer C_5 para continuar la prolongación de la cadena experimenta adiciones de unidades de C_5 , produciendo en secuencia componentes C_{10} , C_{15} , y C_{20} . La dimerización del último produce el fitoeno, el primer carotenoide C_{40} , vía una reacción de condensación.

Existen 750 carotenoides diferentes que han sido aislados de las fuentes naturales. De éstos, alrededor de 500 se han caracterizado satisfactoriamente.

Tradicionalmente, los carotenoides se nombraron en función de la fuente de la que se aislaron por primera vez. Así el término caroteno proviene del nombre científico de la zanahoria (*Daucus carota* L.), mientras que los pigmentos aislados del pensamiento (*Viola tricolor* L.) y algunas algas de género *Fucus* se denominaron violaxantina y fucoxantina.

El color permite monitorizar su separación mediante cromatografía en columna y en capa fina y para caracterizarlos se utilizan diferentes métodos de espectroscopia.

a) Espectro de absorción electrónica ultravioleta visible (UV/Vis)

El espectro de absorción de los carotenoides se debe al sistema de dobles enlaces de su cadena hidrocarbonada. La posición de las bandas de absorción máxima (normalmente tres) es función del número de dobles enlaces de su molécula y del disolvente empleado para la medida.

b) Espectro de fluorescencia

El único carotenoide que puede ser detectado por su fluorescencia a temperatura ambiente es fitoflueno, que en TLC, bajo luz UV_{360nm} , muestra una intensa fluorescencia verde-amarillenta.

c) Espectroscopía de Infrarrojo

El espectro de IR da una información rápida sobre los grupos -OH y C=O presentes en muchos carotenoides. Es muy útil la información que esta técnica proporciona sobre dobles enlaces conjugados y enlaces C-H , presentes en todos los carotenoides, así como acerca de la isomería *cis/trans*. Los espectros resultantes son a su vez más sencillos cuanto más simétrica es la estructura.

6.1. Clasificación de los carotenoides

Estructuralmente se clasifican en dos grandes grupos: carotenos (que son hidrocarburos y sólo contienen carbono e hidrógeno) y xantofilas (carotenoides que además contienen átomos de oxígeno).

Carotenos	Xantofilas
α -caroteno	Flavoxantina
β -caroteno	Luteína
γ -caroteno	Criptoxantina
Licopeno	Rubixantina
Annatto	Violaxantina
Bixina	Rodoxantina
Norbixina	Crianaxantina
Paparika	Zeaxantina
β -apo-8'-carotenal	Astaxantina
β -apo-8'-carotenoico	

Tabla 4.1. Principales carotenoides

A los carotenoides generalmente se les denomina con nombres comunes que incluyen las variaciones estructurales de los anillos laterales, en especial la posición del enlace doble. El β -caroteno, hoy es denominado β,β -caroteno, para indicar que los dos anillos de los extremos tienen enlace doble en la misma posición relativa. El α -caroteno, se denomina β,ϵ -caroteno.

En general para los carotenos se usa el sufijo *caroteno*, y para las xantofilas el sufijo *ina*.

Químicamente se clasifican como terpenoides, es decir, están formados básicamente por ocho unidades de isopreno (es decir, los cuarenta átomos de carbono), de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula.

6.2. Características de los carotenoides

La introducción secuencial de dobles enlaces alternativos en el fitoeno (3 enlaces dobles conjugados) a ambos lados de la molécula y un proceso de deshidrogenación, da lugar al fitoflueno (5 enlaces dobles conjugados), ξ -caroteno (7 enlaces dobles conjugados) y así

sucesivamente hasta los 11 enlaces conjugados que posee el licopeno. Éste último sirve de sustrato básico para la formación de la mayor parte de los carotenoides cíclicos; con la ciclación de uno o de los dos finales de molécula, el camino biosintético se va ramificando formando así los distintos carotenoides. Siguiendo a la ciclación, la inserción de grupos funcionales de oxígeno, por ej. hidroxí y epoxi, produce xantofilas, como la luteína y zeaxantina [56].

El espectro visible de los carotenoides es bastante característico en el rango de 400 a 500 nm.

En los carotenoides naturales sólo se encuentran tres elementos: C, H y O. Como resultado de ello, los dos grupos metilo centrales de la cadena de polieno están separados por seis átomos de carbono, mientras que el resto lo están por cinco. Parece ser que a partir del licopeno todos los demás carotenoides se pueden considerar formalmente derivados, ya sea por hidroxilación, ciclación u oxidación, o bien por combinación de estas reacciones [9].

La numeración de los carbonos en los carotenoides se muestra en la figura 5.1 y va de los extremos hacia el centro, del 1 al 15 y del 1' al 15', siendo la numeración de los metilos del 16 al 20 y del 16' al 20' respectivamente.

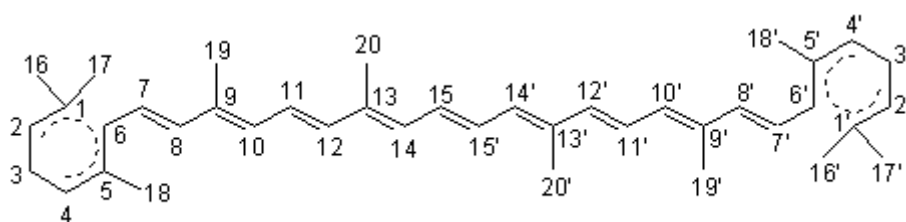


Figura 5.1. Numeración de los carbonos en los carotenoides

Los carotenoides poseen diferentes grupos terminales con la misma estructura central, conociéndose unos setenta grupos distintos, que abarcan más de setecientos compuestos conocidos, y continuamente se describen nuevos carotenoides. Algunos grupos terminales presentes en las moléculas de los pigmentos carotenoides se muestran en la figura 5.2.

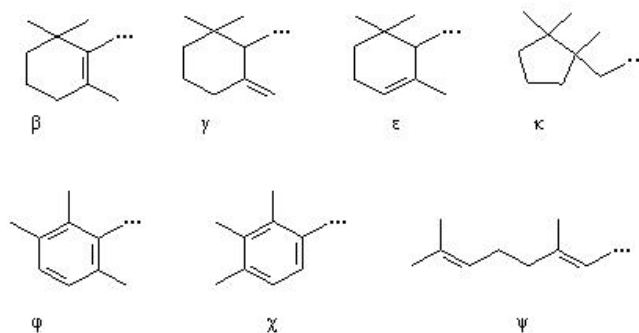


Figura 5.2. Grupos terminales de los carotenoides

La mayoría de ellos tiene un esqueleto central de C_{40} , aunque en la actualidad se han identificado algunos que poseen más de 40 átomos de carbono y otros que poseen menos de 40 átomos de carbono como los apocarotenoides, debido probablemente a escisiones en uno (β -apo-8'-carotenal, pigmento presente en el níspero y cítricos) (figura 5.3.), o ambos extremos de la molécula (crocetina, pigmento característico del azafrán) (figura 5.4.). Otros carotenoides con un número de átomos de carbono diferente de 40 son los norcarotenoides, (como la peridinina) (figura 5.5.), en los que uno, dos o tres átomos de carbono han sido eliminados del esqueleto hidrocarbonado, o los secocarotenoides (como la β -carotenona) en los que se ha roto un enlace entre carbonos adyacentes (excepto los carbonos 1 y 6 de los anillos). Otros carotenoides poseen 45 o 50 átomos de carbono, y se forman por la adición de unidades isoprenoides a los grupos terminales, como por ejemplo la decaprenoxantina. En cuanto a los retrocarotenoides (como la rodoxantina), la posición de los dobles enlaces a lo largo de la cadena poliénica está invertida, de forma que los carbonos 15 y 15' están unidos por un enlace simple.

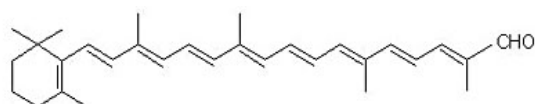


Figura 5.3. β -apo-8'-carotenal

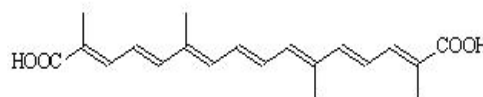


Figura 5.4. Crocetina

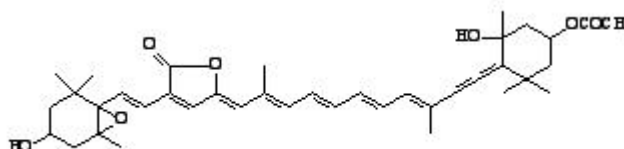


Figura 5.5. Peridinina

Los carotenoides acíclicos desprovistos de anillos β , no son provitamina A.

El caroteno más sencillo es el licopeno (figura 5.6.), otros carotenos se forman por ciclación de los extremos de su cadena. Las xantofilas se forman inicialmente por la hidroxilación de carotenos. Éstas pueden estar presente en forma de grupo hidroxilo (zeinoxantina, lactucaxantina, etc.), metoxilo (esferoidenona, espiriloxantina, etc.), epóxido (anteraxantina, licopeno-1,2-epóxido, etc.), carbonilo (capsantina, esferoidenona, etc.) o carboxilo (norbixina, neurosporaxantina, etc.), principalmente. Otros grupos oxigenados presentes en carotenoides son acetatos (fucoxantina, dinoxantina, etc.), lactonas (peridinina, uriólido, etc.) y sulfatos (caloxantina-3-sulfato, nostoxantina-3-sulfato, etc.).

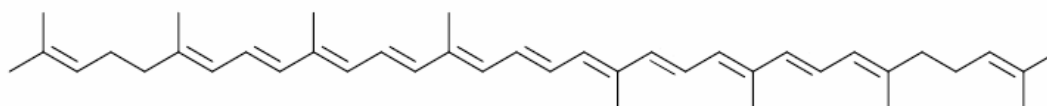


Figura 5.6. Licopeno

Los carotenoides son los responsables de la gran mayoría de los colores amarillos, anaranjados o rojos presentes en los alimentos vegetales, y también de los colores anaranjados de varios alimentos animales, debido a la presencia en su molécula de un cromóforo que consiste, principalmente, en una cadena de dobles enlaces conjugados. Sin embargo, algunos tienen polienos cromóforos que son demasiados cortos para ser detectados por el ojo humano.

El análisis y fuente más abundante de carotenoides se encuentra en el tejido de las plantas, aunque también se encuentran en microorganismos, insectos, pájaros, pescados y otros animales. Sólo las plantas y los microorganismos, no obstante, pueden sintetizar carotenoides de nuevo. La naturaleza produce alrededor de 100 millones de toneladas de pigmentos de carotenoides por año.

Existen ciertas variaciones considerables en la composición geométrica de isomerización de un caroteno de diferentes fuentes naturales y entre productos naturales y sintéticos.

La asociación de carotenoides con proteínas estabiliza a los pigmentos además de extender el rango de colores a verde, azul y púrpura. Así, el máximo de absorción de astaxantina en acetona es 478 nm, mientras que el de la α -crustacianina es 632 nm, de ahí su coloración azulada. Analíticamente, el color de los carotenoides es de gran importancia, ya que un cambio de color durante el análisis es indicativo de degradación o de modificación estructural de los pigmentos.

Debido a su estructura, los carotenoides están sujetos a muchos cambios químicos inducidos por las distintas condiciones de procesamiento que se emplean en la industria alimentaria. Por ello, desde un punto de vista nutricional, es de gran importancia conocer qué factores intervienen en la degradación de estos compuestos, ya que su pérdida, además de producir cambios en el color del alimento, conlleva una disminución de su valor nutritivo.

No todos los carotenoides tienen las mismas propiedades, destacando solo algunos de los cientos existentes en la naturaleza. Para empezar la zeaxantina (figura 5.7.), carotenoide presente en el maíz y en las yemas de huevos, protegen a la vista del daño solar, la luteína (figura 5.8.) que también protege la vista la encontramos en las espinacas y melón.

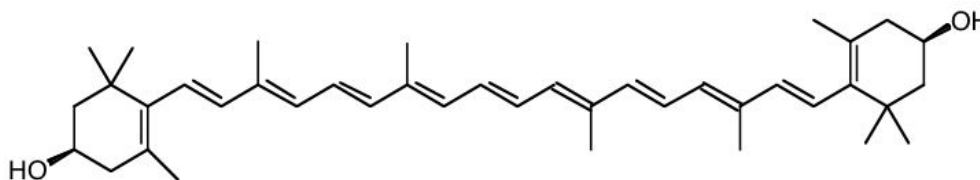


Figura 5.7. Zeaxantina

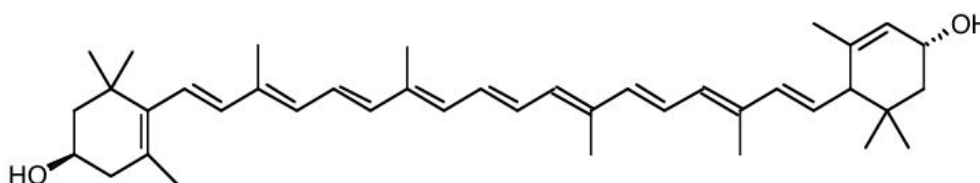


Figura 5.8. Luteína

El β y α -caroteno lo encontramos, en gran cantidad en la zanahoria, y se comportan como una provitamina A sin los perjuicios de esta por sobredosis, además de ser un potente antioxidante celular, protegiendo el preciado ADN de los daños exteriores, y por lo tanto de cáncer.

6.3. Propiedades

Las funciones naturales y las acciones biológicas de los carotenoides están determinadas por las propiedades físicas y químicas de las moléculas, que se definen por la estructura molecular.

El color y sus propiedades potenciales antioxidantes son consecuencia del rasgo estructural más llamativo de estos compuestos –el largo sistema de dobles enlaces conjugados–. Esta cadena poliénica es la responsable de la habilidad de los carotenoides a absorber la luz en la región del visible, lo que le da unas fuertes propiedades de coloración amarilla, naranja o roja [12].

Los carotenoides son solubles en disolventes orgánicos apolares como acetona, metanol, éter dietílico y otros. Debido a su carácter hidrofóbico se encuentra normalmente en ambientes lipófilos, como en membranas, si bien su asociación con proteínas o reacciones de glicosilación les permiten también estar presentes en medios acuosos.

6.3.1. Propiedades físico-químicas

6.3.1.1. Solubilidad

Con muy pocas excepciones, los carotenoides son lipofílicos. Son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, como acetona, alcohol, éter dietílico, cloroformo y acetato de etilo. Ya que la acetona es miscible en agua, este tipo de solvente es de los más utilizados para las extracciones de carotenoides de materiales biológicos que contienen agua. En este caso, el principio de “semejante disuelve semejante” es válido. Son realmente solubles en éter de petróleo, hexano, y tolueno. La cristalización de los carotenoides puede dificultar la disolución en estos disolventes pero podrían disolverse entonces en benceno y diclorometano.

6.3.1.2. Absorción de la luz

El sistema de los dobles enlaces conjugados constituye el absorbente de luz del cromóforo que confiere a los carotenoides su atractivo color, y proporciona el espectro de absorción en el visible que sirve como base para su identificación y cuantificación. El color permite al analista monitorizar los diferentes pasos analíticos de los carotenoides. La pérdida o cambio de color en cualquier momento durante el análisis nos da una inmediata indicación de degradación o modificación estructural.

El espectro UV-Vis es la primera herramienta para el diagnóstico de identificación del carotenoide. La longitud de onda de máxima absorción (λ máx.) y la forma del espectro son características del cromóforo. Contra más largo es el cromóforo, más alta es la longitud de onda de máxima absorción. Los carotenoides acíclicos absorben a longitudes de onda máximas más largas que los carotenoides cíclicos con el mismo número de enlaces dobles conjugados en cuya conjugación se extiende hacia los anillos, debido al hecho que en el último, hay fuerzas estéricas.

La mayoría de los carotenoides absorbe como máximo a tres longitudes de onda, con lo que resulta un espectro con tres picos. Contra más grande sea el número de dobles enlaces conjugados, más alto será el valor de λ máx. De este modo, el carotenoide insaturado más acíclico como el licopeno, con 11 dobles enlaces conjugados, es rojo y absorbe en las longitudes de onda de (λ máx. 444, 471, 502 nm). Para que un carotenoide tenga un color perceptible tiene que tener al menos 7 dobles enlaces conjugados; como por ejemplo el ξ -caroteno que es amarillo claro y, siendo también acíclico, su espectro tiene tres picos bien definidos, pero éstos están a unas longitudes de onda más bajas (λ máx: 378, 400, 425). En cambio los dos carotenoides que preceden al ξ -caroteno, fitoeno y fitoflueno, con 3 y 5 dobles enlaces respectivamente, son incoloros [56].

Los carotenoides en solución obedecen la ley de Lambert-Beer –su absorbancia es directamente proporcional a la concentración–. De este modo, los carotenoides se pueden cuantificar espectrofotométricamente.

6.3.1.3. Isomerización y oxidación

Los carotenoides muy insaturados son propensos a la isomerización y oxidación.

El calor, la luz, los ácidos y la adsorción en una superficie activa (p. ej. alúmina) promueve la isomerización de los carotenoides *trans*, su configuración habitual, a la forma *cis*. Esto deriva en algo de pérdida de color y de actividad de la provitamina A.

La degradación oxidativa, la principal causa de una extensa pérdida de carotenoides, depende de la disposición del oxígeno y además se estimula con la luz, las enzimas, metales, y co-oxidación con hidroxiperóxidos lípidos. Los carotenoides parecen tener diferentes susceptibilidades a la oxidación. La formación de epóxidos y apocarotenoides (carotenoides con una cadena de carbonos corta) parece ser el paso inicial. Subsiguientes fragmentaciones producen una serie de componentes de bajo peso molecular similar a aquellos que se producen en las oxidaciones de ácidos grasos. De esta manera, la pérdida total del color y la actividad biológica son la consecuencia final.

Las condiciones necesarias para la isomerización y oxidación de los carotenoides se producen durante la preparación, el procesamiento y el almacenaje del producto. También están sujetos a isomerización y oxidación durante los análisis, y se tienen que tomar medidas preventivas para garantizar la fiabilidad de los resultados de la analítica.

6.3.1.4. Estabilidad

La cadena poliénica es a también altamente responsable de la inestabilidad de los carotenoides, p. ej. su susceptibilidad a la oxidación por el aire, e isomerización causada por calor, luz o productos químicos. Ciertas reacciones químicas de algunas partes de la molécula, especialmente los grupos terminales, pueden llevar a modificaciones estructurales indeseadas.

Los carotenoides son pigmentos estables en su ambiente natural, pero cuando los alimentos se calientan, o cuando son extraídos en disolución en aceites o en disolventes orgánicos, se vuelven mucho más frágiles. Así, se ha comprobado que los procesos de oxidación son más acusados cuando se pierde la integridad celular, de forma que en alimentos vegetales triturados, la pérdida de compartimentación celular pone en contacto sustancias que pueden modificar estructuralmente, e incluso destruir los pigmentos. No todos los tipos de cocinado afectan en la misma medida a los carotenoides, de forma que la pérdida de estos pigmentos aumenta en el siguiente orden: cocinado con microondas < cocinado al vapor < hervido < salteado.

Los carotenoides, excepto algunas excepciones, son insolubles en agua y por lo tanto las pérdidas por lixiviación durante el lavado y procesamiento de frutos son mínimas. Otros tratamientos empleados en las industrias alimentarias, como por ejemplo el tratamiento a alta presión, parecen no afectar significativamente a los niveles de carotenoides en diversos productos vegetales. El escaldado industrial de los alimentos puede producir pérdidas de carotenoides, si bien la inactivación enzimática que produce previene pérdidas posteriores durante el procesado y almacenamiento. En cambio, la congelación, la adición de antioxidantes

y la exclusión del oxígeno (vacío, envases impermeables al oxígeno, atmósfera inerte) disminuyen las pérdidas durante el procesado y almacenamiento de los alimentos [43].

La destrucción de estos pigmentos reduce el valor nutritivo de los alimentos e induce una decoloración y una pérdida de sus características organolépticas. El grado de decoloración va a depender fundamentalmente de la presencia de agentes oxidantes en el medio (sobre todo oxígeno molecular) y de que se comunique energía suficiente para que la reacción de degradación tenga lugar. Si las condiciones oxidantes son débiles y la energía suministrada no es suficiente, se vuelve a restaurar el orbital molecular con la posibilidad de que la estructura adopte la configuración *cis* o *trans*, en función de que haya habido rotación en el enlace. Si las condiciones son muy severas, el grado de degradación progresa, fragmentándose entonces el pigmento.

En resumen puede decirse que los factores que influyen en la degradación de carotenoides en sistemas modelo son varios, como por ejemplo estructura del carotenoide, exposición a la luz, actividad de agua, temperatura, presencia de oxidantes o antioxidantes, presencia de sulfitos, etc.

A pesar de todo, está claro que el licopeno es más estable en el tejido y la matriz del fruto del tomate que de forma aislada o purificada debido al efecto protector que ejercen los constituyentes celulares como el agua. Además, se debe tener mucho cuidado para minimizar la pérdida de licopeno por oxidación o isomerización durante la extracción, almacenamiento, manipulación y análisis para tener en cuenta los cambios de causa-efecto.

6.3.2. Propiedades fisiológicas

La propiedad que más destaca, por su importancia a nivel fisiológico y dietético en humanos y otros animales, es que algunos carotenoides presentan actividad de provitamina A. La vitamina A es esencial para la visión nocturna y necesaria para mantener sanos la piel tejidos superficiales. El número de carotenoides precursores de vitamina A oscila entre 50 y 60. La vitamina A proviene de fuentes animales como el huevo, la carne, la leche, el queso, la crema, el hígado de mamíferos, el riñón y el aceite de hígado de bacalao y de hipogloso.

Prácticamente todos los carotenoides que se obtienen de la dieta y aquellas moléculas que se encuentran en la sangre y en los tejidos, son extremadamente hidrofóbicos.

En alimentos naturales, los carotenoides pueden estar presentes en formas microcristalinas, como el licopeno en los tomates. Esta propiedad ha tenido claramente importantes consecuencias para su biodisponibilidad. Los *cis*-isómeros generalmente tienen menor tendencia de cristalizar que todos los *trans*-isómeros, de modo que los *cis*-isómeros son fácilmente solubles, absorbidos y transportados.

El licopeno y la luteína son los carotenoides principales del suero o plasma, y un número de alimentos relativamente limitado son los principales contribuidores de estos carotenos en la dieta.

Por ejemplo, las zanahorias, los cítricos y los tomates poseen una mayor contribución del suministro dietético de α -caroteno, β -criptoxantina y licopeno, respectivamente. También hay que tener en cuenta que diferentes tipos de alimentos afectan la biocompatibilidad de los carotenos en sangre, y tener precaución en el uso de alimentos específicos [44].

Los β -carotenos son precursores de la vitamina A. Se trata de un pigmento vegetal que, una vez ingerido, se transforma en el hígado y en el intestino delgado en vitamina A. Es un componente antioxidante que favorece la no aparición del cáncer, especialmente el de pulmón, boca y estómago.

El α -caroteno y la criptoxantina también tiene propiedades antioxidantes, pero se encuentra en menor proporción que el β -caroteno.

El licopeno tiene propiedades anticancerígenos como los β -carotenos. El licopeno parece reducir las probabilidades del cáncer de próstata, pulmón, estómago, vejiga y cuello del útero. Tiene además la propiedad de disminuir el colesterol en la sangre y prevenir las inflamaciones de la próstata.

La luteína protege la planta de la radiación solar, esta misma propiedad resulta eficaz para proteger la retina humana de las radiaciones ultravioleta del sol.

6.3.3. Propiedades metabólicas y genéticas

El metabolismo de los carotenoides se ha estudiado desde principios de la década de 1920 cuando fueron encontrados ciertos pigmentos amarillos de diversas plantas para estimular el crecimiento de ratas con deficiencia de vitamina A. Más tarde, en esa misma década, Thomas Moore demostró que el β -caroteno, el más activo de estos pigmentos se convertía en vitamina A en las ratas *in vivo*. Hasta nuestros días, los carotenoides han sido sólo considerados fisiológicamente en los mamíferos en términos de su actividad de provitamina A. La biocompatibilidad y el metabolismo de los carotenoides están significativamente afectados por la dieta, y asociados a factores fisiológicos y ambientales; esto incluye la consumición de grasas junto con los carotenoides, la liberación de los ácidos bilícos necesarios para formar las micelas lipídicas, la cantidad de carotenoides presentes en la dieta, tratamiento y cocción, estado nutricional, (vitamina A y concentración de carotenoides), factores individuales como pueden ser dolencias o enfermedades y factores genéticos.

El licopeno recientemente ha sido estudiado tanto en humanos como en animales de experimentación.

Está claro que la absorción y el metabolismo de diferentes carotenoides varían notablemente.

6.3.3.1. Función biológica

Aunque no se conoce hasta ahora de manera precisa la función de los carotenoides en las plantas, los autores sugieren que por conferir colores a tejidos y órganos importantes para la reproducción vegetal (flores y frutos), servirían como factor importante en la atracción de insectos polinizadores.

Por otro lado, dada la actividad antioxidante demostrada y su capacidad de absorber radiaciones en el espectro visible, podrían ser factores importantes en procesos como la fotosíntesis.

Los grupos polares funcionales proporcionan un enfoque para interaccionar con más moléculas polares con la finalidad de permitir al carotenoide participar en acontecimientos en medios acuosos subcelulares o en una interfase o membrana.

Las interacciones entre moléculas de carotenoides también tienen un efecto significativo en las propiedades. Siendo altamente hidrofóbicas, los carotenoides muestran una fuerte tendencia a agregarse y cristalizarse en medio acuoso. La acumulación de los carotenoides como agregados microcristalinos es común en los cromoplastos de las plantas superiores (ej. licopeno en tomate). Los agregados cambian las propiedades físicas de los carotenoides, -absorción de luz y reactividad química, por ejemplo- así como su tamaño efectivo y su facilidad de solubilización, afectando así su facilidad de absorción y biodisponibilidad en animales y su habilidad para introducirse y funcionar en estructuras subcelulares.

6.3.3.2. Efectos en los seres humanos

6.3.3.2.1. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN INTESTINAL

Los carotenoides en la dieta alimentaria existen de dos principales formas: como verdadera solución en aceite, como en el aceite de palma rojo, o como partes de matrices de las frutas y verduras. La matriz es normalmente compleja, consistente en fibra, polisacáridos digestivos y proteínas. Debido a que los carotenoides no son totalmente divididos durante la preparación de alimentos o durante su paso a través del intestino, su compatibilidad puede variar desde < 10% como en gran parte de las zanahorias crudas, hasta > 50% en preparaciones comerciales o soluciones de aceite.

El proceso de absorción no parece implicar a los transportadores específicos epiteliales.

Los carotenoides de las frutas parecen ser más eficientes.

La absorción de los carotenoides y su presencia en el plasma están influenciados por su forma geométrica isomérica.

En general, los carotenoides polares son mejor absorbidos por los humanos que los no-polares.

6.3.3.2.2. TRANSPORTE EN PLASMA

Como los carotenoides no están covalentemente vinculados a las lipoproteínas, su concentración en plasma es dependiente en gran medida de la dieta. En un contexto más fisiológico las concentraciones estables en el plasma dependen de las cantidades en la dieta, su eficiencia de la absorción intestinal, su absorción de los tejidos. Los carotenoides en el plasma representan < 10% del total de los lípidos del cuerpo.

Dependiendo de la variedad de la dieta de estos carotenoides, puede, no obstante, haber variaciones en la concentración del suero debido a los cambios estacionales. Las concentraciones medidas por la mañana son más altas que aquéllas tomadas por la tarde.

La concentración media también varía con la edad, pero no de la misma manera en todos los carotenoides. La concentración de plasma de la mayoría de los carotenoides excepto del licopeno tiende a incrementar con la edad. En Estados Unidos, el licopeno es generalmente de las más altas concentraciones que se encuentran en el plasma.

6.3.3.2.3. EFECTOS EN LA INGESTA DIETÉTICA

Los carotenoides se encuentran en todos los tejidos del cuerpo. Sobre la base del peso de los tejidos en el cuerpo humano, los carotenoides están principalmente presentes en la grasa, el hígado, la piel y el plasma. Algunos tejidos relativamente pequeños, como testículos, y glándulas suprarrenales, tienen una alta concentración de carotenoides, mientras que órganos mayores como músculos y cerebro tienen bajas concentraciones.

Más de 20 estructuras diferentes de carotenoides se han detectado en la leche de las mujeres lactantes, demostrando que la leche materna es una fuente importante de carotenoides y vitamina A para los bebés.

Ya que el $\geq 90\%$ de los carotenoides en el cuerpo se encuentra en los tejidos y que $< 10\%$ en el plasma, el contenido de los de mayor interés en los tejidos son el licopeno y β -caroteno, ya que lo encontramos en concentraciones más elevadas.

6.3.3.2.4. METABOLISMO

Los carotenoides de las plantas y los microorganismos se oxidan a una variedad de componentes con pocos átomos de carbono. Muchas de las enfermedades serias de los humanos, incluidas el cáncer y enfermedades del corazón, en alguna etapa envuelve procesos de oxidación mediados por radicales libres como $\text{HO}\cdot$ y $\text{ROO}\cdot$. Para ser un antioxidante efectivo, una molécula como es un carotenoide tiene que eliminar estos radicales del sistema, o bien reaccionando con ellos para producir productos inermes o rompiendo las reacciones en cadena de los radicales libres.

Se ha demostrado que los carotenoides pueden ser antioxidantes efectivos en solución orgánica bajo condiciones definidas, especialmente en concentraciones bajas de oxígeno. La situación *in vivo* no está clara. Las concentraciones de carotenoides en tejidos mamíferos generalmente son mucho más bajas que aquéllas usadas para demostrar un comportamiento antioxidante en sistemas modelo. Para actuar como un antioxidante en vivo, el carotenoide necesitaría incorporarse en los tejidos en el lugar correcto y en concentración adecuada relativa al agente oxidante y a la molécula que va a proteger. No obstante, de ningún modo es cierto que estas condiciones vayan a cumplirse.

Mucho se conoce sobre las propiedades físicas y químicas de los carotenoides en simples soluciones orgánicas. En vivo, no obstante, los carotenoides son parte de un sistema mucho más complejo –las células vivas– y están estrechamente próximos a otros componentes como

las proteínas y los lípidos, frecuentemente en estructuras organizadas y ordenadas como las membranas. El carotenoide tiene que ser capaz de encajar en este sistema complejo en la correcta ubicación y orientación.

El conjunto de la forma, el tamaño, la hidrofobicidad de un carotenoide es obviamente la principal característica que determina la habilidad de un carotenoide a encajar en las estructuras subcelulares.

Los detalles estructurales que caracterizan al carotenoide individual define la orientación precisa que los carotenoides pueden adoptar así como las interacciones de la molécula con las que la rodean.

6.3.3.2.5. PROTECCIÓN CONTRA ENFERMEDADES

La mayoría de las investigaciones recientes se focalizan en el papel de los carotenoides como lípidos antioxidantes que son capaces de proteger contra la oxidación y otros procesos destructivos mediados por radicales libres, aunque efectos más específicos en el sistema inmunitario están ahora en investigación. Para que esto sirva, los carotenoides tienen que introducirse en el tejido específico y encontrar la localización intracelular correcta.

6.3.3.2.6. VITAMINA A Y RETINOIDES

El rol nutricional más importante de los carotenoides es como provitamina A. El aldehído involucrado en la vitamina A, el retinal, como el cromóforo de los pigmentos visuales en el ojo, es primordial en el proceso de la visión. La deficiencia de vitamina A es todavía un importante problema nutricional en muchos países en vías de desarrollo donde sus consecuencias, ceguera y muerte prematura, son a día de hoy muy comunes, particularmente la población más susceptible, los niños. La vitamina A también tiene funciones sistémicas importantes como el crecimiento y eficiencia reproductiva, y en el mantenimiento del tejido epitelial y la prevención de su queratinización. La importancia de este último efecto ha llevado a la síntesis de un amplio rango de componentes relacionados, los retinoides, y a la evaluación de estas sustancias para uso terapéutico para tratar problemas de piel como el acné y también como agentes de prevención del cáncer.

6.3.3.2.7. ESTUDIOS DEL CASO DE CÁNCER

Una fuente de error es la posible degradación de los carotenoides en las muestras de suero durante su conservación, especialmente por encima de -70°C .

En estudios de casos de control, la ingesta de carotenoides o las concentraciones de éstos en los tejidos de los pacientes de cáncer pueden haber sido alterados por el cáncer, debido al tratamiento de la enfermedad o a los cambios en los hábitos de la dieta o metabolismo causado por la enfermedad. Por esta razón, los estudios realizados en los inicios de la enfermedad son más fiables, ya que la información del estado del caroteno se recoge antes del diagnóstico del cáncer. En tales estudios, el proceso de la enfermedad, aún y así puede afectar al estado del caroteno. Los carotenoides pueden ser simplemente tomados a partir de la ingesta de frutas y verduras.

La fuerza de la relación entre la exposición a los carotenoides y el riesgo de cáncer depende del equilibrio entre la cantidad de carotenoides disponible y el área de exposición a otros factores de riesgo, tal como el humo del cigarro. Así, la relación puede diferir según las concentraciones de otros factores, haciendo difícil valorar la relación entre el estado del caroteno y el riesgo de cáncer. Las concentraciones de carotenoides en la sangre y en el tejido adiposo han sido asociadas con varios factores potencialmente relacionados con el riesgo de cáncer.

Varios alimentos, nutrientes y modelos dietéticos también pueden confundir las relaciones entre las mediciones de los carotenoides y la enfermedad. La ingesta de carotenos, por ejemplo, está fuertemente asociada con la ingesta de algunos nutrientes potencialmente protectores, tal como la vitamina E, vitamina C y flavonoides, porque están incluidos en el mismo tipo de comida y causan el comportamiento de agrupamiento dietético.

Dentro de los carotenoides más ampliamente usados en los estudios de cáncer se encuentra el β -caroteno en la concentración del suero o plasma. Otro carotenoide también predominante en el sistema circulatorio humano es el licopeno [32].

MECANISMOS DE PREVENCIÓN DEL CÁNCER

Se han propuesto varios mecanismos y acciones para contribuir a la prevención de los efectos de los carotenoides sobre el cáncer. La mayoría de estos mecanismos han sido examinados sólo *in vitro* y que es probable que puedan ocurrir *in vivo* interacciones y caminos más complejos entre la mayoría de los componentes dietéticos.

La consumición de tomates frescos, salsa de tomate, y pizza, que cuenta con un volumen de licopeno en la ingesta de la dieta, está relacionada significativamente con una menor incidencia en el cáncer de próstata.

6.3.3.3. Propiedades antioxidantes

El cuerpo está continuamente expuesto a reaccionar con especies oxigenadas, que pueden dañar biológicamente macromoléculas relevantes tal como el ADN, proteínas y lípidos. Estas reacciones pueden estar envueltas en patologías de varias enfermedades, incluida el cáncer. Las especies reactivas al oxígeno pueden afectar a la expresión genética. Un número de componentes que ocurren de manera natural pueden “hurgar” en busca de especies reactivas al oxígeno.

Las propiedades antioxidantes de los carotenoides están relacionadas con su sistema extendido de dobles enlaces conjugados. La actividad antioxidante depende de una serie de factores, como su estructura química (tamaño, número de sustituyentes, configuración *cis* o *trans*, etc.) su concentración, la presión parcial de oxígeno o su interacción con otros antioxidantes, sobre todo las vitaminas C y E.

Los carotenos también reaccionan con radicales. Se ha supuesto que el radical se añade a la molécula del caroteno para formar una reacción menor intermedia.

En la mayoría de los casos, el licopeno ha sido el caroteno más reactivo estudiado, seguido del β -caroteno.

En un estudio con hombres saludables, no fumadores, se les sometió a un periodo de dos semanas de pruebas y fueron alimentados diariamente con 40 mg de zumo de tomate que contenía licopeno, seguido de zumo de zanahoria con 22,3 mg de β -caroteno y 15,7 mg de α -caroteno. Todas las dietas disminuyeron los niveles de endógenos de los linfocitos de la cadena de ADN.

6.3.3.4. Enfermedades cardiovasculares

Los estudios de casos de control sugieren que los carotenos y las dietas ricas en carotenos pueden prevenir las enfermedades cardiovasculares.

6.3.3.5. Desórdenes fotosensibles

Los carotenoides, incluidos el β -caroteno, se han utilizado con éxito en el tratamiento de ciertas enfermedades fotosensibles durante más de 25 años. Esta aplicación clínica se deriva del reconocimiento que los carotenos protegen a la bacteria fotosintética, las algas y las plantas verdes contra la fotosensibilidad.

6.3.3.6. Degeneración macular y cataratas asociadas a la edad

La ingesta dietética de carotenos puede ser importante en la prevención de dos condiciones oculares relacionadas con la degeneración macular y las cataratas seniles. La mácula es una región pequeña y amarillenta en el centro de la retina. La degeneración de la mácula es la causa más común de una ceguera irreversible en personas de más de 65 años. Las cataratas también son problemáticas, pero su extracción y el cambio por una lente nueva es la operación más frecuente entre la población anciana. Las cataratas son el resultado de la foto oxidación de las proteínas de la lente del cristalino, que se acumulan, se agregan y precipitan en la lente.

Los estudios donde la concentración de carotenos en sangre fue usado como medida de exposición también sugiere efectos protectores contra el riesgo de degeneración macular asociada a la edad.

6.3.4. Factores que influyen en su composición

La composición de los carotenoides en los alimentos se ve afectada por factores como el cultivo o la variedad; parte de la planta que se consume; estado de madurez; clima o situación geográfica de producción; la cosecha y la manipulación de la post-cosecha; procesado y almacenamiento.

Los carotenoides no están uniformemente distribuidos en el producto en sí mismo. Normalmente están más concentrados en la piel que en la pulpa de la fruta y la hortaliza.

6.3.4.1. La Oxidación e isomerización

La degradación de los carotenoides se debe fundamentalmente a reacciones de isomerización y oxidación durante el procesamiento y almacenamiento, siendo las consecuencias, pérdida de color y actividad biológica y formación de compuestos volátiles que dan sabor tanto deseable como no deseable en algunos productos. La oxidación depende del oxígeno, metales, enzimas, lípidos insaturados, prooxidantes o antioxidantes; exposición a la luz; se acelera por la temperatura; el tipo y el estado físico del carotenoide presente; dureza del tratamiento al que se exponga; empaquetado del material y condiciones de almacenamiento; de si el pigmento se encuentra *in vivo* o *in vitro* y de las condiciones ambientales.

Pero ésta se reduce por la adición de antioxidantes. Los alimentos que contienen antioxidantes, como tocoferoles o vitamina C, conservan mejor los carotenoides y por tanto, su color. El sistema de dobles enlaces conjugados es muy susceptible de oxidación y de provocar reacciones en cadena de radicales libres, y es por ello que es el responsable de la inestabilidad general de los carotenoides, especialmente en condiciones oxidantes.

Por ejemplo el licopeno, pigmento responsable de la coloración de los tomates, es muy estable en ese fruto, pero extraído y purificado es muy lábil.

6.3.4.2. La temperatura

La influencia de la temperatura en la estabilidad de los pigmentos es clara; tanto para reacciones anhidras como hidratadas, siempre actúa como acelerador de la reacción de degradación. Por lo general, los carotenos con mayor actividad biológica son aquellos que tiene todos sus dobles enlaces en forma de isómero *trans*, que se transforman parcialmente en la forma *cis* durante tratamientos térmicos en ausencia de oxígeno, esta reacción de isomerización se puede efectuar durante el proceso de esterilización de productos enlatados, con lo que se pierde parte del poder vitamínico de los carotenos.

6.3.4.3. La luz

La acción intensa de la luz sobre los carotenos induce su ruptura con la consiguiente formación de compuestos incoloros de bajo peso molecular. Estas reacciones tienen mucha importancia en la industria alimentaria ya que los carotenos pierden, además de su función biológica de provitamina A, su color característico.

6.3.4.4. El pH

Aunque los carotenoides extraídos no son relativamente resistente a valores de pH extremos, los ácidos y álcalis pueden provocar isomerizaciones *cis/trans* de ciertos dobles enlaces, reagrupamientos y desesterificaciones, lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de manipularlos en laboratorio con fines analíticos.

6.4. Licopeno

El licopeno es un pigmento vegetal, dentro de la familia de los carotenoides, soluble en grasas, que aporta el color rojo característico a los tomates, sandías y en menor cantidad a otras frutas y verduras. Es una sustancia que no sintetiza el cuerpo humano, sino los vegetales y algunos microorganismos, debiéndolo tomar en la alimentación como micronutriente.

Se obtiene fundamentalmente a partir de fuentes naturales, hongos y muy especialmente tomates y productos del tomate; se encuentran también en pequeñas cantidades en algunas frutas, como la sandía, la papaya, y el pomelo rosa. No obstante recientes avances en métodos de separación han demostrado que el licopeno está mucho más distribuido en la naturaleza de lo que uno piensa. Podemos encontrar hasta 42 procedencias diferentes entre plantas y frutos que contienen licopeno. [Véase Anexo II]. La concentración de este caroteno, depende tanto de la procedencia como de su grado de maduración.

El cambio de color que se produce en la maduración de los frutos supone una modificación de los pigmentos presentes en el mismo. La pérdida de color verde debida a la desaparición de la clorofila va asociada a la síntesis de compuestos carotenoides que imparten su color rojo típico al tomate. Así existe una diferencia en el contenido de licopeno según el estado de madurez del fruto. En los tomates, la biosíntesis del licopeno aumenta drásticamente durante el proceso de maduración. Esta maduración está normalmente acompañada por lo que se conoce como carotenogénesis debido a que las clorofilas se descomponen y los cloroplastos se transforman en cromoplastos. Las características del simple carotenoide del cloroplasto da lugar a una composición más compleja, y los carotenoides aumentan exageradamente en número y cantidad. La carotenogénesis continúa incluso después de la cosecha mientras el fruto permanece intacto.

Sin embargo, los sistemas de extracción son costosos y el licopeno presenta una baja estabilidad, lo que ha limitado su utilización como colorante. El uso del licopeno (E 160d) como colorante está autorizado por el Parlamento Europeo.

El licopeno es uno de los mayores carotenos de la dieta de los Norte Americanos y Europeos, siendo calificado como nutraceutico por cuyo interés existe una gran demanda.

El licopeno es el carotenoide predominante en la composición de los tejidos humanos, concentrándose especialmente en la próstata, lo que podría explicar su fuerte acción preventiva en la aparición de cáncer de próstata.

El licopeno existe en la naturaleza en forma *trans*, y la formación del isómero *cis*, que se da principalmente con calor y luz, tiende a variar su actividad biológica.

En el proceso de extracción, a altas temperaturas, la degradación del licopeno es más rápida que su isomerización, y bajo intensa luz, la isomerización es la principal reacción.

Los isómeros del licopeno se han detectado tanto en muestras biológicas como en los alimentos, pero en los alimentos normalmente contiene principalmente *trans*-licopeno mientras que las muestras biológicas tienen mayor proporción de *cis*-isómeros.

Se han encontrado diferencias en la permisividad de ingestión dietética de licopeno; desde 1 mg/día en España hasta 2-3 g/día en los Estados Unidos. Las concentraciones de licopeno en las muestras de sangre también varían considerablemente entre países. La fuente predominante de licopeno en los países desarrollados son los tomates, que son consumidos tanto como fruta o como constituyente de los alimentos procesados. El licopeno parece ser mejor absorbido del producto procesado del tomate que de la propia hortaliza fresca, esto puede ser debido a que los *cis*-isómeros se absorben mejor que todos los *trans*-licopenos. La alta absorción del licopeno proveniente de los alimentos procesados puede explicar la alta concentración de suero del licopeno en sangre de las personas de los países desarrollados como Francia, Gran Bretaña, Irlanda y los Estados Unidos y las bajas concentraciones o su ausencia en sangre de personas de los países en vías de desarrollo como China, India, Pakistán y Tailandia.

Desafortunadamente, las restricciones de distribución de las fuentes de licopeno en la dieta, limita la utilidad de este caroteno como un marcador general de la ingesta de vegetales.

El licopeno, aunque se absorbe bien en las soluciones de aceite y es asumido por el hígado y otros órganos, se metaboliza pobremente a través de caminos desconocidos. Muchos isómeros del licopeno están presentes en el plasma humano y los tejidos, los más importantes son todos los *trans* y el 5-*cis*-licopeno.

6.4.1. Propiedades químicas del licopeno

El licopeno (figura 5.9) es un caroteno, su fórmula molecular del licopeno es $C_{40}H_{56}$ y su peso molecular es de 536,85 g, también se le llama ψ,ψ -caroteno. La estructura general del licopeno es un hidrocarburo alifático con 11 enlaces conjugados –doble enlaces carbono, que hacen que sea soluble en grasas, en lípidos y tenga color rojo–. Siendo acíclico, el licopeno posee una simetría plana y no tiene actividad de vitamina A. Como tiene una larga cadena poliénica conjugada, es particularmente susceptible a la degradación oxidativa. Los factores químicos y físicos que conducen a ello son las elevadas temperaturas, exposición a la luz, oxígeno, extremos de pH y superficies activadas [34].

Posee propiedades antioxidantes, y actúa protegiendo a las células humanas del estrés oxidativo, producido por la acción de los radicales libres, que son uno de los principales responsables de las enfermedades cardiovasculares, del cáncer y del envejecimiento. Un gran número de procesos cancerígenos y degenerativos están asociados a daños oxidativos sobre el genoma y los mecanismos genéticos de control de la proliferación y diferenciación celular. El licopeno actuaría como un poderoso neutralizador de radicales libres (óxido y peróxido) atenuando los daños oxidativos sobre los tejidos.

La única propiedad química del licopeno derivada de su estructura es que es un carotenoide acíclico con 11 enlaces dobles conjugados linealmente ordenados que lo hacen extremadamente hidrofóbico y soluble en tejidos, y solventes orgánicos, como el benceno, hexano, éter de petróleo, etc.

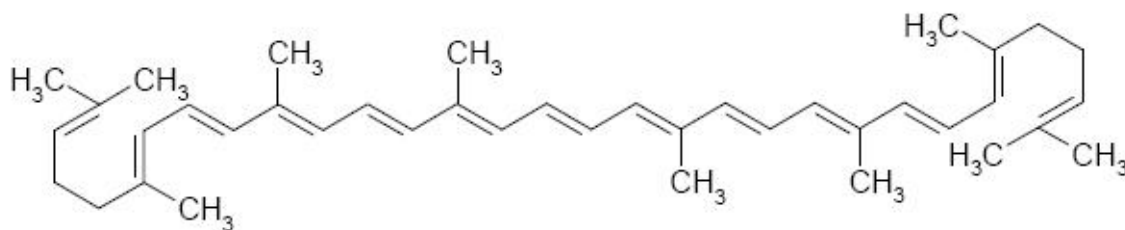


Figura 5.9. Licopeno

Otro tipo de cambio que experimente el licopeno como polieno es la *cis-trans* isomerización. Con pocas excepciones, el licopeno de origen natural existe predominantemente en la configuración *todo-trans*, la forma más estable termodinámicamente.

Como resultado de los 11 dobles enlaces conjugados carbono-carbono en su estructura, el licopeno podría asumir teóricamente 2^{11} o 2048 configuraciones geométricas.

El licopeno de los tomates consiste en un 94-95% *todo-trans*, 3-5% *5-cis*, 0,1% *9-cis* y <1% otros *cis*-isómeros.

6.4.2. Absorción, transporte y metabolismo del licopeno.

Existe una gran controversia sobre la manera en que el cuerpo humano absorbe licopeno. Esta absorción parece ser dificultosa porque estos carotenos están fuertemente vinculados a macromoléculas en la mayoría de alimentos.

La absorción del licopeno consiste en 4 fases principales:

1. Digestión y liberación de la matriz del alimento.

Las acciones de masticación y digestión facilitan la liberación del licopeno de la matriz alimentaria, mientras que la presencia de grasas y ácidos bilícos conjugados facilitan su absorción. La eficiencia de este proceso está influenciada por varios factores, incluidos el estado físico del licopeno en la matriz, el tamaño de partícula antes y después de la masticación, y varios procesos digestivos.

2. Incorporación dentro de las micelas mezcladas.

En el intestino delgado, el licopeno ingerido se incorpora en las micelas formadas vía la interacción de los productos lipídicos de la digestión y los ácidos bilícos. La formación de las micelas es necesaria para la absorción del licopeno puesto que esta absorción en los carotenoides es muy lenta cuando se ingieren en ausencia del lípido adecuado. Por contra, una dieta rica en fibra, que interfiere con la formación de micelas, puede disminuir la absorción total del licopeno [58].

3. Absorción a través de las células epiteliales del intestino delgado.

La concentración del licopeno en el plasma humano está determinada por su ingesta, el nivel de colesterol en plasma, y, en un menor grado, por el estilo de vida y factores demográficos como el estado.

Los lípidos son la clave en la disolución de los carotenos y por consiguiente, en su absorción. El licopeno es absorbido de manera más eficaz cuando por ejemplo el zumo de tomate se calienta con un lípido suplementario. Algunos autores declaran que los tomates preparados con aceite de oliva -característica de la dieta Mediterránea- facilitan la absorción del licopeno.

La disolución de los carotenos en la fase lipídica se realiza en el estómago y el duodeno: entonces -como resultado de la acción de las sales bÍlicas y las lipasas pancreáticas, esta fase lipídica, gota a gota, entra en el duodeno y forma vesículas lipídicas multi-lamelares. Es durante la absorción intestinal donde se da la interacción con otros carotenos. La absorción humana de los *cis* isómeros es mayor que la de los isómeros *trans* tal y como se confirma tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto es debido a que los isómeros *cis* son menos propensos a cristalizar o a formar agregados y por lo tanto pueden ser más solubles en soluciones lipofílicas y transportados eficazmente dentro de las células o entre los tejidos. Por esta misma razón, se cree que los isómeros *cis* aumentan la actividad biológica del licopeno.

4. Transporte al torrente sanguíneo

En el plasma, el licopeno es transportado exclusivamente por lipoproteínas, y sigue el mismo curso que los triglicéridos ingeridos en la comida.

En cuanto al transporte dentro del cuerpo, los carotenos circulan por la corriente sanguínea. En el plasma, se transportan a través de lipoproteínas de un modo que depende de la estructura del caroteno. El licopeno se encuentra en la parte hidrofóbica de la lipoproteína, mientras que los carotenos con grupos polares se pueden encontrar en la interfaz acuosa de la superficie de la lipoproteína. El licopeno permanece estable durante el proceso gástrico y el de digestión intestinal.

La deposición del licopeno en una variedad de tejidos refleja la eficacia de la transferencia de las lipoproteínas del plasma. El mecanismo responsable para la deposición e inmovilización de los carotenoides en el tejido adiposo, entre otros, así como el transporte intracelular de los carotenoides, todavía no se le encuentra una clara explicación.

El alimento procesado y cocinado provee casi las mismas concentraciones del total de los *todo-trans* licopeno pero también altas concentraciones de isómeros *cis*. Se han encontrado pequeñas cantidades de *cis* isómeros en tomates o productos procesados de tomate, mientras que en sangre y tejidos humanos, parece haber concentraciones mucho más grandes.

Según diversos autores, existe información contradictoria sobre la distribución de licopeno en los tejidos que demuestran que no está distribuido igual y uniformemente, ya que los estudios de investigación en la biodisponibilidad de los carotenoides está limitado por varios factores, entre ellos el uso de sujetos humanos, que es costoso así como el tiempo y la labor empleados.

Esta disponibilidad además también depende de varios factores como el procesado de alimentos o ingestión de grasas.

6.4.3. Beneficios para la salud

Muchos problemas de salud son causados por los radicales libres que interactúan con macromoléculas y dañan las proteínas, los lípidos y el ADN. La mayoría de los beneficios del licopeno para la salud humana, se supone que ocurren vía su capacidad de ser un agente oxidante supresor de los radicales libres de oxígeno. Aunque el oxígeno no es un radical libre –definido como molécula que tiene un número impar de electrones en el orbital externo– es muy reactivo y puede formar muchas especies de oxígeno que reacciona con biomoléculas.

La importancia actual del licopeno se debe principalmente a las propiedades beneficiosas de este pigmento en la salud humana, en la prevención de enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer (p. ej. trato digestivo, cérvix, pecho, piel, vejiga y próstata), osteoporosis, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas, infertilidad masculina e incluso transmisión de madre a bebé del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Los efectos protectores del licopeno son atribuidos en parte, a su habilidad a actuar como antioxidante. El licopeno protege los organismos humanos del ataque de agentes patógenos responsables de un gran número de enfermedades.

La prevención de diversas enfermedades causadas por la degeneración de tejidos debida al oxígeno altamente reactivo, los radicales libres y los componentes tóxicos, del medio, que causan daños en los vasos sanguíneos y en las células nerviosas, han llevado a la búsqueda e investigación de sustancias con alto potencial antioxidante, como es el licopeno.

Cada vez existen más estudios epidemiológicos que sugieren que el consumo de licopeno tiene un efecto beneficioso sobre la salud humana, reduciendo notablemente la incidencia de las patologías cancerígenas sobre todo, de pulmón, próstata y tracto digestivo, cardiovasculares y del envejecimiento. También existen evidencias científicas de que previene el síndrome de degeneración macular, principal causa de ceguera en la gente mayor de 65 años.

El licopeno posee un mayor poder antioxidante que el β -caroteno, y se viene utilizando en productos cosméticos con gran potencial comercial, principalmente por la gran demanda de productos con este tipo de características, ocasionada en la preocupación global por el cuidado y prevención de enfermedades de la piel causadas por el alto nivel de contaminación del medio ambiente y la exposición directa a los rayos del sol [17].

7. EXTRACCIÓN DEL LICOPENO DEL TOMATE

En este capítulo se explica el procedimiento llevado a cabo en el laboratorio con el objetivo de obtener el licopeno del tomate para luego poderlo usar como colorante.

Existen diferentes técnicas de extracción del licopeno, que las explicaremos a continuación. Cabe destacar que para la cuantificación del licopeno, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es la más precisa y adecuada hasta el momento.

7.1. Fundamento teórico, aislamiento de pigmentos

Como los carotenos son menos estables que otros muchos grupos de sustancias, deben usarse precauciones y procedimientos específicos para minimizar el riesgo de degradación y formación de partículas indeseables. Particularmente, la exposición al oxígeno, el calor, la luz, los ácidos y en algunas ocasiones, las bases, tienen que ser evitadas en la medida de lo posible. Todas las operaciones deben ser llevadas a cabo en una atmósfera inerte (nitrógeno o argón) a baja temperatura (20° C aprox.), con luz oscura o difusa, y con solventes recién purificados y libres de peróxidos. Incluso después de que los carotenos hayan sido extraídos de los tejidos, y sean puros y en estado cristalino, son susceptibles de oxidarse y de transformarse rápidamente si se almacenan en presencia de rastros de oxígeno; los carotenos en estado sólido deben ser guardados al vacío o bajo un gas inerte (nitrógeno o argón). Los carotenos también son susceptibles de recibir daños oxidativos *in vivo* si son expuestos a especies oxidantes o a radicales libres que puedan generarse.

La indicación más normal de que el caroteno se ha estropeado es el blanqueamiento, esto es, la pérdida de color, debido a la rotura del cromóforo.

7.1.1. Técnicas de extracción

Un buen procedimiento de extracción será aquel que recoja todos los pigmentos en solución, sin provocar cambios en ellos. Para la extracción de carotenoides, a partir de tejidos de las plantas, se recomienda un paso inicial de molienda o mezclado del tejido. [51]

Los carotenoides normalmente se extraen de muestras biológicas con solventes orgánicos miscibles en agua, muy comúnmente la acetona. La elección del solvente depende del material biológico, su pretratamiento, la composición del carotenoide y si el objetivo de la extracción es completa o parcial. Lo usual es una extracción completa y el análisis cuantitativo subsiguiente.

La extracción de pigmentos se realiza, en general, mezclando el tejido con pequeñas cantidades de disolvente y agitando continuamente hasta que el disolvente está lleno de carotenoides, seguidamente la mezcla se filtra al vacío o se centrifuga para recuperar los sólidos, aunque se suele preferir lo primero por garantizar mejor su eliminación y finalmente, los filtrados recogidos se llevan a volumen, y se vuelve a agitar con mas disolvente, se repite la operación tantas veces como se necesario o que el tejido se quede sin color.

La molienda y filtración se llevan a cabo rápidamente en oscuridad o luz verde tenue para prevenir la fotodegradación y/o alomerización de los pigmentos.

Los procedimientos de extracción y purificación son muy variados en la práctica y dependen del material de partida, que condiciona la forma de tratamiento. Los carotenoides se extraen generalmente de la materia vegetal usando etanol, acetona, metanol o mezclas de metano y éter de petróleo, transfiriéndose finalmente a este último del cual se purifican y se separan de otros pigmentos por cromatografía. En ocasiones, es conveniente sumergir la planta rápidamente en agua hirviendo y posteriormente en agua helada antes de la molienda para así mejorar la extracción con un disolvente orgánico y reducir posibles acciones enzimáticas.

La extracción de pigmentos y vegetales o algas es un proceso que requiere una adecuada elección del método a seguir y con frecuencia se introducen variantes a la metodología seleccionada, para adecuarla a cada caso particular.

El abanico de posibilidades es altísimo y esto hace que frecuentemente la elección del sistema de extracción implique, además de una revisión bibliográfica, ensayos tentativos en el laboratorio de los sistemas seleccionados. No obstante, ante un producto de nuevo estudio, lo más indicado es aplicar una metodología conocida y ya usada con algún otro similar y posteriormente, introducir las modificaciones pertinentes para adecuarlo a cada caso particular.

7.1.1.1. *Adecuación del extractante a la muestra*

Para la extracción de pigmentos en productos vegetales en los que el contenido lipídico a extraer sea despreciable, es útil en general cualquier disolvente orgánico, ya que en mayor o menor extensión todos los pigmentos van a ser solubles. Generalmente, cuando los propósitos no son muy específicos, casi todos utilizan acetona, metanol, etanol y mezclas acuosas de estos dos últimos disolventes, con los que se consigue realizar la extracción en un tiempo prudencial y con bajo gasto de disolvente.

Para la correcta extracción es imprescindible poner en íntimo contacto la muestra con el disolvente. Se suele poner como punto final a la extracción cuando se obtiene extractos incoloros. Para disolventes con alta capacidad de penetración, la extracción suele ser fácil, sin necesidad de triturar la muestra exhaustivamente. Para disolventes con menor capacidad (acetona o etanol) o hidrofóbicos (hexano), la extracción suele ser mas complicada ya que primero hay una deshidratación de la muestra y luego ya se extraen los carotenoides.

7.1.2. Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina aparece a finales de los años 50 y pronto empieza a ser un método versátil y efectivo para purificar carotenos, y permanece válido incluso en laboratorios que poseen buenas instalaciones de HPLC. La TLC se usa ampliamente en la purificación de los carotenos para los análisis de espectroscopía y para una identificación mediante patrones. Una particular ventaja es que, aparte de los intermediarios biosintéticos como el fitoeno y el fitoflueno, que se localizan y examinan bajo luz ultravioleta, los carotenoides se colorean y se pueden ver en la placa de sílica gel con una gran sensibilidad.

Algunas ventajas de la TLC respecto HPLC es la flexibilidad y simplicidad. Una mayor elección de solventes se pueden usar como fase móvil para la TLC y se pueden desarrollar simultáneamente varias muestras. Algunos adsorbentes que son efectivos en TLC no están disponibles de forma apropiada para HPLC. Se usa una placa nueva para cada muestra, con lo cual se evita la pérdida y la contaminación de las muestras.

Los carotenoides, al ser coloreados, se detectan fácilmente. La resolución de una mezcla desconocida a través de la TLC con pocos solventes seleccionados da una rápida visión de la posible composición y del número aproximado de componentes y sus cromóforos, indicados por el color. La polaridad de cada componente individual también se puede estimar, con tal de que se use el sistema adecuado. Los compuestos que carecen de color, se pueden detectar impregnando las placas con indicadores fluorescentes, y se detectan por su fluorescencia bajo una longitud de onda de luz UV de 350 nm. Esto es particularmente importante en la bioquímica del carotenoide, donde la fluorescencia es un indicador sensible de la presencia de carotenoides incoloros como el fitoeno y el fitoflueno, así como la degradación u oxidación de productos de carotenoides.

La sílica gel G es el adsorbente más usado en la técnica de TLC. La separación que se obtiene depende de la polaridad de la muestra, contra más polares sean los componentes, más fuerte y diferenciada será la adsorción. La designación G significa sulfato de calcio (gypsum en inglés).

La cromatografía de los carotenos acíclicos pueden verse afectada por su cristalización en la placa de TLC, causando rayas y una pobre resolución. Esto se puede solucionar incluyendo una pequeña cantidad de diclorometano (<10%) en la cámara de desarrollo.

El bajo precio y la simplicidad de esta técnica ha permitido que se emplee ampliamente para separar y monitorizar pigmentos, sobretudo para muestras pequeñas y separaciones delicadas. Los adsorbentes usados incluyen sílica gel y otros silicatos, celulosa, azúcar, óxido de magnesio y otros soportes específicos de TLC. Para fines cualitativos de identificación, y guardando las debidas precauciones, es una técnica insustituible. El objetivo principal de esta operación es aislar el mayor número de pigmentos con una primera cromatografía general, para continuación proceder a la purificación individual de cada componente, y finalmente, verificar su identidad mediante pruebas específicas. Cada banda separada, se raspa y eluye de la placa con un disolvente apropiado. Los carotenos son particularmente susceptibles de oxidarse de modo que las muestras deben ser tratadas lo más rápido posible. Todos los pasos cromatográficos deben llevarse a cabo en la oscuridad (cubrir la cámara de desarrollo con un trapo negro) y, si es necesario, rociar con N₂.

La elección del disolvente dependerá, lógicamente, de la naturaleza del compuesto que se va a separar y del material en que la separación va a llevarse a cabo. Una regla general para la elección del disolvente es la comparación de la polaridad del mismo y la de la sustancia que se desea separar. Así, para sustancias solubles en agua se elegirán capas de celulosa o gel de sílice. Para sustancias menos polares se elegirán capas de alúmina o gel de sílice activada, empleando un disolvente no acuoso apropiado.

Una técnica sencilla para la elección del disolvente a emplear en una determinada separación consiste en colocar una serie de manchas de la muestra a intervalos en una placa. Los disolventes se prueban aplicándolos en los centros de las manchas mediante un capilar muy fino, lo que permite desarrollar las manchas radialmente. El disolvente más apropiado será el que tenga la semejanza entre las manchas más separadas.

Las muestras se aplican con un capilar sobre la línea base, cuando el capilar toca la placa, se libera su contenido en la placa y se forma una pequeña mancha dejando evaporar el disolvente. La evaporación del disolvente en la capa fina es tan rápido que no es necesario el empleo de un secador.

Cuando varias sustancias están presentes en una mezcla, cada una tiene su característica solubilidad y propiedades de adsorción, dependiendo de los grupos funcionales en su estructura. En general, la fase estacionaria es más apolar y atrae a las sustancias apolares. La fase móvil es normalmente más polar que el adsorbente y disuelve fácilmente sustancias que son más polares. Así, mientras las sustancias más apolares se desplazan lentamente hacia arriba, o casi nada, las sustancias polares se desplazan más rápido si el solvente es suficientemente polar.

Pueden aplicarse varias gotas sobre la misma mancha, dejando evaporar el disolvente entre cada aplicación.

La separación de cada componente se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente, un disolvente) y a una fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser papel o gel de sílice). Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación.

Para hidrocarburos, una buena elección es hexano o éter de petróleo.

Se calcula el factor de retraso (R_f) que permite identificar sustancias en una mezcla. El R_f de una sustancia en el mismo soporte y con el mismo eluyente siempre es constante.

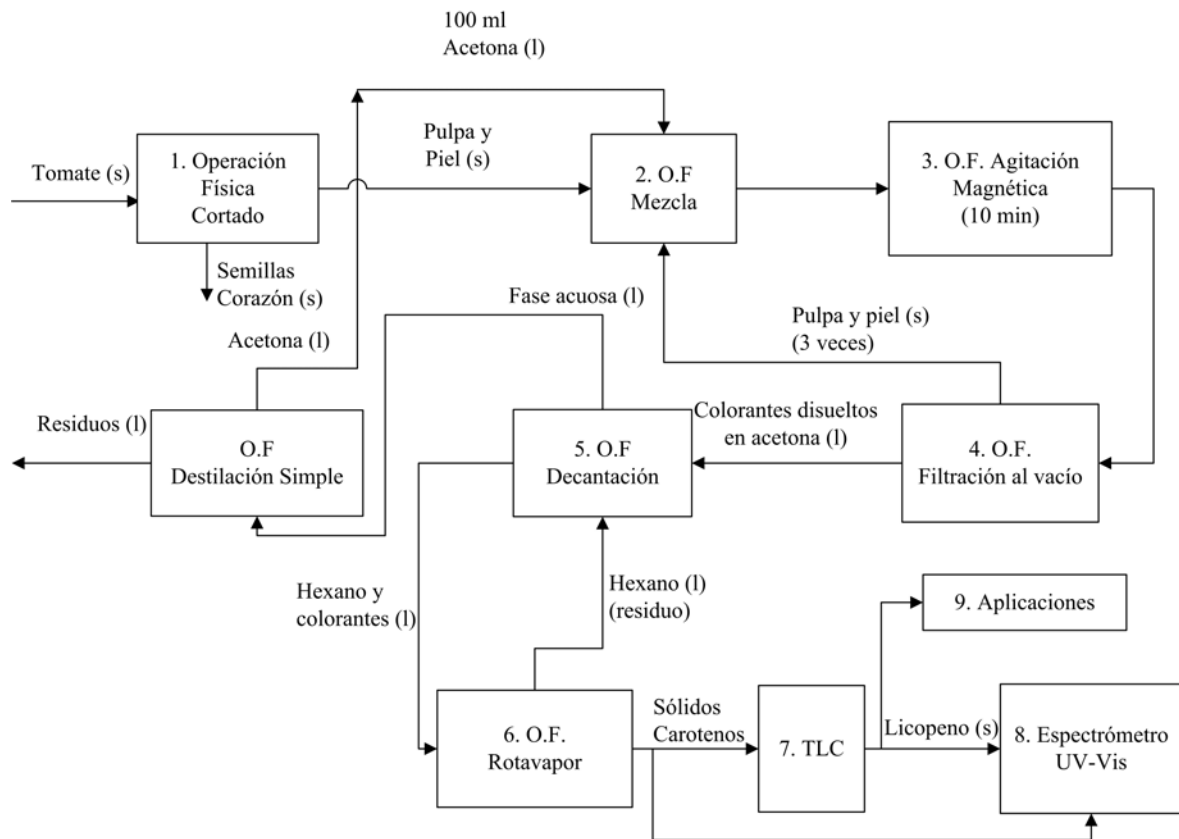
$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el eluyente}} \quad (\text{Ecuación 7.1.})$$

El desarrollo de las placas se lleva a cabo en cubetas con tapas, estas cubetas pueden ser de diferentes formas y tamaños. Para acondicionar la cubeta se cubre de eluyente hasta una altura de 0,5 a 1 cm, se deja un tiempo reposando y así llega al equilibrio. Durante el desarrollo no puede moverse la cubeta. [1]

El revelado de las placas se ve sin necesidad de aplicar ningún producto ya que son colorantes pero también se puede efectuar en el UV ya que puede haber alguna sustancia que sea fluorescente y se necesite ver en luz ultravioleta.

7.2. Parte experimental

7.2.1. Diagrama de bloques: obtención y análisis del licopeno



7.2.2. Material utilizado:

- Vasos de precipitado de 100 ml, 250 ml, 400 ml y 600 ml
- Probetas de 10 ml, de 50 ml, 100 ml
- Cuentagotas
- Varita de vidrio
- Embudos forma alemana
- Embudo sinterizado
- Embudos de decantación de 500 ml y 1 l
- Viales de topacio
- Matraz hondo redondo 250 ml
- Matraz aforado de 100, 25 y 10 ml
- Erlenmeyers de 250 ml
- Refrigerante de serpentín
- Manta térmica
- Codo
- Bomba del vacío
- Trípode
- Pinzas de doble brazo
- Nuez doble
- Capilares de vidrio
- Balanza (precisión 0,001 g)
- Agitador magnético
- Placas de sílica gel
- Pipetas automáticas de 5 ml y 1 ml
- Aparato destilación al vacío (Rotavapor)
- Gomas conexión aparato destilación
- Termómetro normal
- Soporte
- Cubetas TLC
- Tapones de plástico
- Espectrofotómetro

7.2.3. Reactivos utilizados

- Acetona (l)
- Hexano (l)
- Éter de petróleo (l)
- Diclorometano (l)
- Éter dietílico (l)
- Nitrógeno (g)

7.2.4. Pasos previos

Previamente se realizaron una serie de ensayos a modo de prueba modificando diferentes parámetros para seleccionar el modo más idóneo de realizar los experimentos. [Véase Anexo III]

7.2.5. Procedimiento

Escogemos diferentes tomates para hacer las pruebas, estos tomates tendrán que ser bastante rojos y maduros, así nos aseguramos que tengan más licopeno. Hay diferentes tipos de tomate, elegimos el de rama, pera, cherry, raf, frito y triturado, los compararemos entre ellos y veremos cuáles tienen más cantidad de licopeno.

Las partes de un tomate son las siguientes:

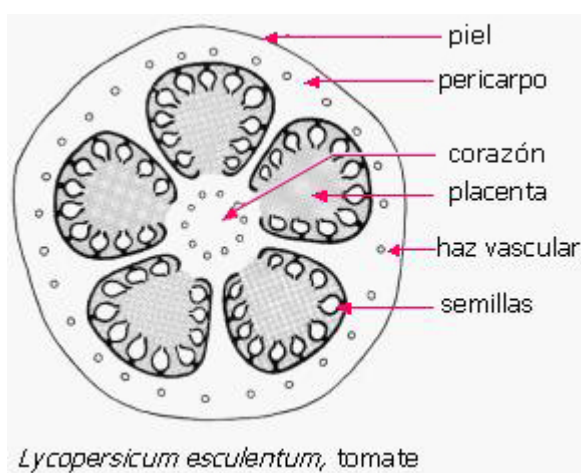


Figura 7.1. Partes del tomate

7.2.5.1. Cortado del tomate

Se separa el pericarpio de las semillas del corazón del tomate (figura 7.2.) para que la muestra sea más homogénea y así para facilitar la extracción. Se trocea en trozos pequeños el pericarpio, que es donde hay más cantidad de licopeno, y desechamos el resto. Una vez troceado, se pesan aproximadamente unos 20 g, se ponen en un vaso de precipitados o erlenmeyer y se le añade 50ml de acetona.

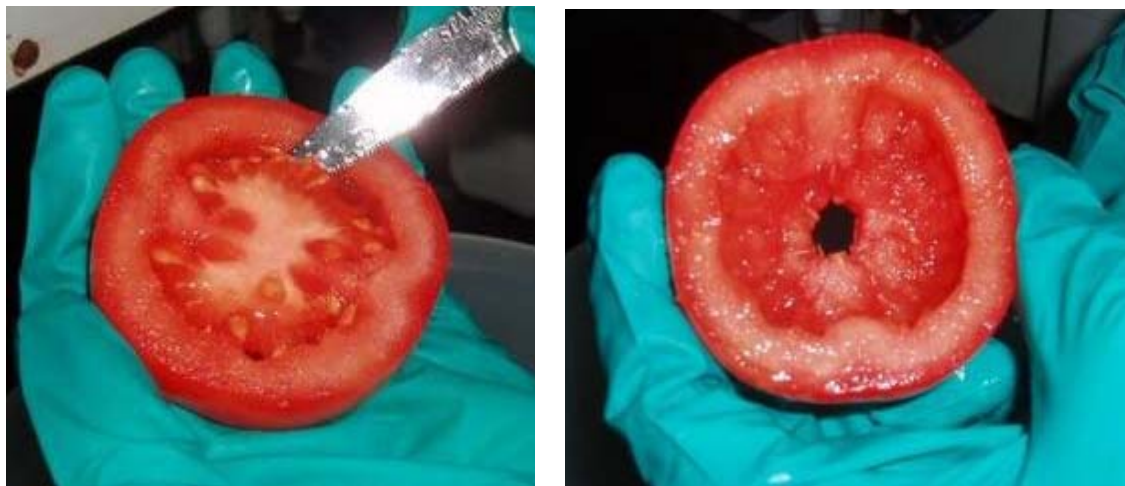


Figura 7.2. Separación del pericarpio del corazón y semillas

7.2.5.2. Agitación magnética

Se lleva a un agitador magnético (figura 7.3.) para que el tomate y la acetona estén en contacto y la mezcla se homogenice. Este procedimiento se repite mínimo tres veces o hasta que ya no quede más color en la solución de muestra.

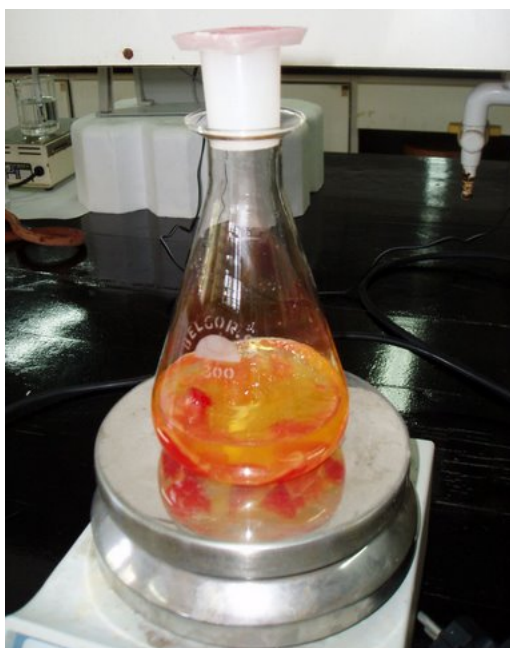


Figura 7.3. Agitación magnética

7.2.5.3. *Filtración al vacío*

Al cabo de unos 10 minutos se procede a la filtración de vacío (figura 7.4.), el extracto acetónico se reserva y se recoge el residuo sólido que ha quedado en el filtro para tratarlo repetidas veces con acetona en el agitador magnético hasta llegar a extractos incoloros. Ese momento nos indicará que se han extraído todos los colorantes.



Figura 7.4. Filtración al vacío

Los extractos acetónicos que se muestran en la figura 7.5 son de diferentes tomates, días y tipo de troceado.

La foto de la izquierda contiene todos los extractos acetónicos juntos de una misma muestra.

En la foto central, se observa cómo de una misma muestra (aplastada con el mortero), en su primera extracción de acetona, la coloración es muy débil debido a la cantidad de agua que ésta contiene, y en las posteriores, ya aparece la coloración propia y característica.

La foto derecha muestra dos extractos del mismo tomate pero preparados de diferente manera, es decir, el vaso de la izquierda se ha cortado en trozos de pequeñas dimensiones mientras que el de la derecha se ha triturado, (se trata del mismo que corresponde a la foto central).



Figura 7.5. Extractos acetónicos

7.2.5.4. Decantación

Los extractos acetónicos de una misma muestra se juntan, se anota el volumen que ocupan y se mezclan con igual volumen de hexano más 100 ml de agua en un embudo de decantación (figura 7.6.). El objetivo es eliminar la materia grasa, lípidos, otros carotenoides, clorofilas e impurezas. Se agita con cuidado y se deja reposar (24h aproximadamente). Se formarán dos fases.

En la capa superior, la fase orgánica, con tonalidad naranja, se encuentran los carotenos. Se vuelve a lavar dos veces más con agua, para eliminar por completo cualquier resto de impurezas que pueda haber.

La fase inferior, correspondiente a la fase de acetona con agua, con el resto de pigmentos en solución, se vuelve a tratar dos veces más con hexano para obtener cualquier carotenoide residual que haya podido quedar.



**Figura 7.6. Embudo de decantación:
adición de agua en el embudo de
decantación**



Figura 7.7. Separación de fases

7.2.5.5. Destilación simple

La fase acetónica se puede volver a reutilizar purificándola en los pasos anteriormente descritos en una destilación simple (figura 7.8.)



Figura 7.8. Destilación simple: separación de la acetona

7.2.5.6. Rotavapor

Una vez terminado ese proceso, se lleva la fase orgánica (fase superior con hexano más los carotenos) en un balón redondo al rotavapor (figura 7.9.) a una temperatura inferior a 40° C, donde por destilación al vacío se evapora todo el hexano y los carotenos se quedan en forma sólida adheridos a las paredes del balón (figura 7.10.).

Para retirar los carotenos de las paredes del balón, los diluimos utilizando para ello una mezcla del 50% (v/v) de éter de petróleo y diclorometano (figura 7.11.). Con un cuenta-gotas lo pasamos a un vial de topacio y se lleva a sequedad con nitrógeno (figura 7.12.). Se tapa el vial y se guarda en el congelador hasta su uso.

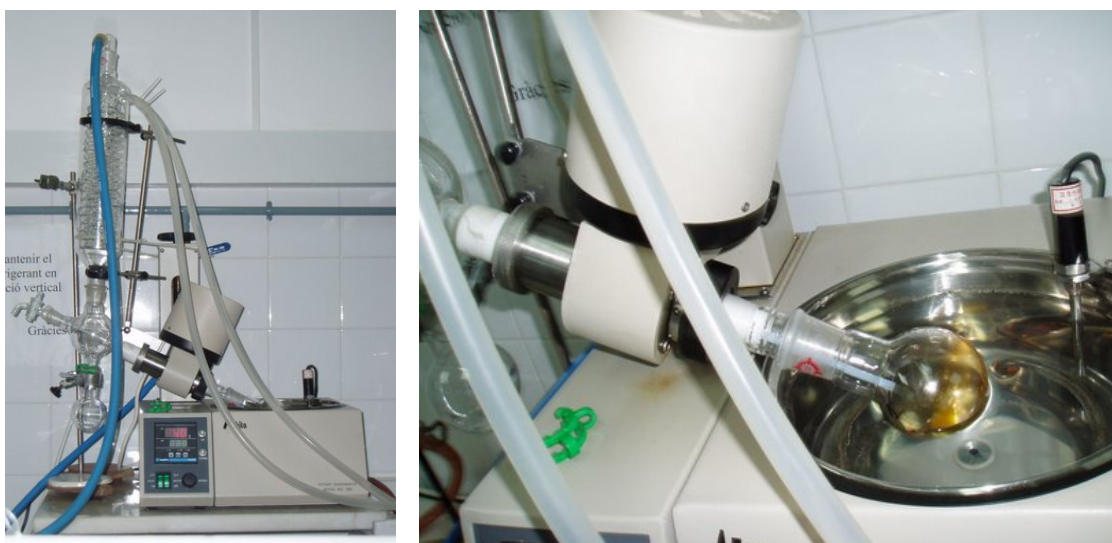


Figura 7.9. Rotavapor: separación de los carotenos por destilación al vacío



Figura 7.10. Carotenos pegados en las paredes



Figura 7.11. Separación de los carotenos de las paredes



Figura 7.12. Secado con nitrógeno

7.2.5.7. *Cromatografía de capa fina (TLC)*

Preparamos una disolución de éter de petróleo con diclorometano (95:5 v/v) como solvente para la cromatografía de capa fina (TLC). Como los carotenos se encuentran en estado sólido, unas cuantas gotas de esta misma solución nos servirá para disolverlos en el mínimo volumen posible y poder aplicarlos con un capilar de vidrio sobre la placa de sílica gel.

La placa de sílica gel se habrá preparado y acondicionado para poder aplicar las muestras de la siguiente manera: con un lápiz se traza una línea base de lado a lado de 1,5 cm de distancia de la base de la placa, en esta línea se marcan unos puntos en forma de cruz a 2 cm de distancia entre ellos, donde se aplicaran los puntos con el capilar. Nunca usar tinta. Se aplican de tal manera que el punto no se disperse y forme una extensa aureola a su alrededor sino que debe ser lo más concentrado posible y eso se consigue presionando suavemente el capilar sobre la placa, dejando que fluya el líquido. (Figura 7.13.)

El resto del disolvente se vuelca en la cubeta de TLC para que se sature de vapor. Cuando ya están puestos los puntos de las muestras con los capilares de vidrio se introduce la placa de sílica gel en la cubeta donde se encuentra el eluyente, que no debe tocar directamente la línea base de la placa y se deja que se desarrolle durante 1 hora en la oscuridad. (Figura 7.14)

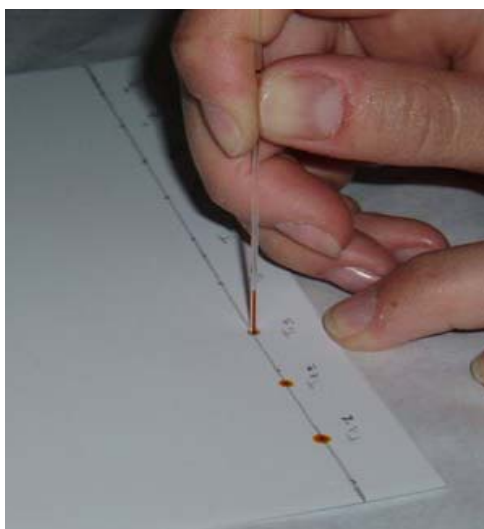


Figura 7.13. Aplicación de los puntos en la placa de Sílica Gel



Figura 7.14. Desarrollo del cromatograma

Transcurrido este tiempo, se retira la placa y se deja que se evapore el solvente. Aparecerán una serie de marcas verticales diferenciadas en la placa. Cada una corresponde a cada componente por separado de la mezcla original de carotenos.

La de más arriba, que se desliza más rápido pertenece al β -caroteno (amarillo); la más retenida y cercana a la línea base de la placa, se halla el licopeno (naranja); entre ésta y el licopeno se aprecia una banda tenue, es el γ -caroteno, que no siempre está. Si se observa la placa bajo luz ultravioleta, se puede ver un vivo color verdoso fluorescente muy cerca del β -caroteno. Se trata del fitoflueno, precursor biosintético y no posee color. (figura 7.15.).

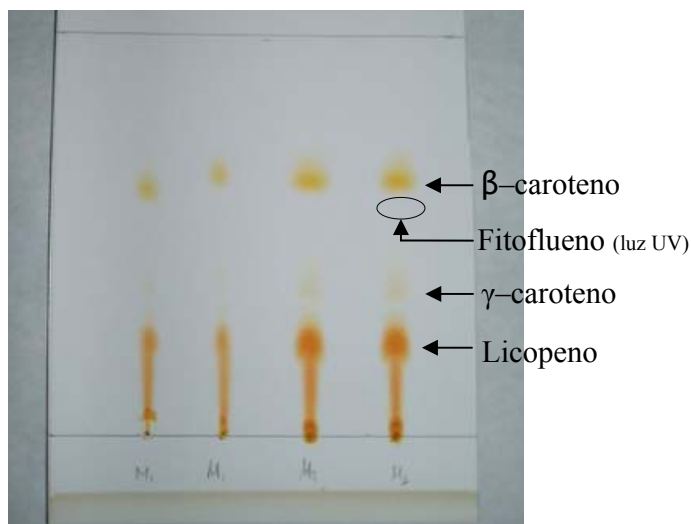


Figura 7.15. Cromatograma de los carotenos ya desarrollados

Las zonas o manchas de los carotenos se tienen que visualizar y marcar, es decir, hay que actuar lo antes posible par evitar el riesgo de oxidación por aire o adsorción irreversible.

Mientras transcurre el desarrollo de la placa, se preparan pequeños embudos con algodón de lana de vidrio en el cuello de éstos, viales y láminas de papel de aluminio de unos 5x5 cm para cada banda que nos interese analizar. El papel de aluminio servirá para recoger el rascado de la mancha. Rápidamente, en el momento en que se evapore el disolvente, la placa de Sílica Gel, se procede a rascar con una espátula cada banda coloreada (figura 7.16), se vuelca sobre la pieza de aluminio y de ahí se vierte al embudo al que se le añaden gotas de éter dietílico hasta que el color desaparezca y se haya vertido en el vial (figura 7.17). La sílica se queda retenida en la lana de vidrio. A continuación procedemos a llevarlo a sequedad con nitrógeno como hemos descrito anteriormente.

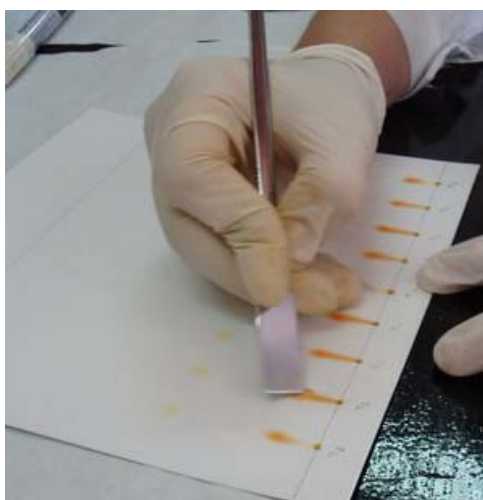


Figura 7.16. Rascando el licopeno de la TLC



Figura 7.17. Embudos con fibra de vidrio

En estos momentos tenemos el licopeno aislado y sólido y ya está listo para su lectura en el espectrofotómetro.

7.2.5.8. Determinación espectrofotométrica

El espectrofotómetro que se utilizó para realizar las lecturas fue el UV-1603 Shimadzu (figura 7.18) el cual debe ser ajustado.

El carotenoide se disuelve en un volumen conocido de hexano. Es esencial su total disolución. Para dar una lectura cero precisa se lee una muestra que sólo contiene solvente hexano. Para ello pondremos hexano en las 2 cubetas, que serán de cuarzo, las colocaremos en las celdas y corregiremos el cero.

Para la lectura de las muestras, éstas se transfieren en una de las cubetas en la celda 1 y se obtiene el espectro de absorción de dicha muestra.



Figura 7.18. Espectrómetro UV-Vis

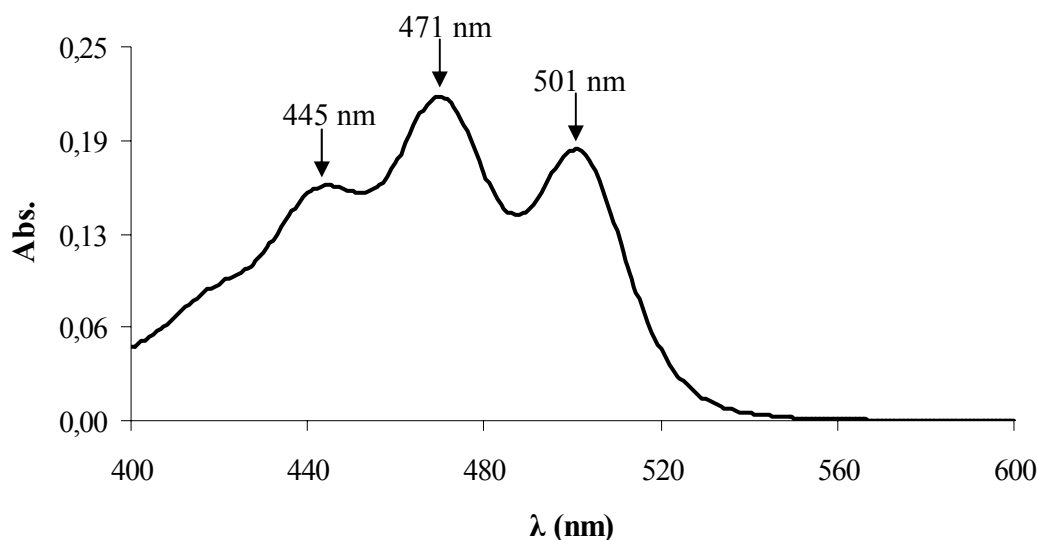


Figura 7.19. Espectro de absorción del licopeno

Como los carotenoides en disolución obedecen la ley de Lambert-Beer, la concentración de licopeno en la solución muestra se calcula relacionando ésta con la lectura de absorbancia de un patrón de concentración conocida a partir de la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon^{\lambda} \cdot b \cdot c \quad (\text{Ecuación 7.2.})$$

A = absorbancia

ϵ^{λ} = coeficiente de absortividad molar a una determinada longitud de onda ($l/mol \cdot cm$)

b = camino óptico (cubeta) (cm)

c = concentración (mol/l)

El coeficiente de absortividad molar está referenciada para muchos carotenoides. Específicamente la del licopeno es 3450 a 471 nm. Y el camino óptico recorrido por la luz es 1 cm. [11]

7.2.5.9. Preparación de las soluciones patrón.

La manipulación del licopeno requiere trabajar con mucho cuidado, ya que una vez abierto tiene duración de 48 horas. Hay que trabajar lo más rápido posible.

No obstante, debemos tener presente la linealidad de la molécula así como la sensibilidad del instrumento para conocer a qué máxima concentración puede el licopeno ser lineal y cumplir la ley de Lambert-Beer. Teniendo en cuenta que la máxima absorbancia a la que realiza la lectura el espectrofotómetro es 3.99 y a partir de la ecuación:

$$C \text{ (mg/l)} = \frac{A \times 10000}{3450}$$

Donde:

C es la concentración en la solución patrón en el espectrofotómetro

A es la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción

3450 es la absorbancia específica $A_{1cm}^{1\%}$ del licopeno en hexano

10000 es el factor de escala

Obtenemos que la concentración máxima que puede leer el instrumento no debe pasar de 11 ppm para que cumpla la linealidad y por lo tanto la ley de Lambert-Beer.

Preparación licopeno de una concentración de 40 ppm

Se prepara la solución madre de 40 ppm, partimos de 1 mg de licopeno comercial; se diluye en 25 ml de hexano. Se homogeniza bien y lo pasamos a un vial de topacio para que no se vea afectado por la luz. Así tenemos:

$$1 \text{ mg licopeno} \times \frac{1000 \text{ ml}}{40 \text{ mg}} = 25 \text{ ml}$$

Preparación de soluciones diluidas de la muestra patrón

Con una pipeta automática pipeteamos los volúmenes apropiados de la muestra madre preparada para obtener las 5 hijas de 10 ppm, 8 ppm, 6 ppm, 4 ppm y 2 ppm. Las muestras derivadas del patrón las enrasamos a 10 ml y también los guardamos en viales de topacio. Se realizará de la siguiente manera:

$$10 \text{ ml} \times \frac{10 \text{ mg}}{11} \times \frac{11}{40 \text{ mg}} = 2,5 \text{ ml de la dis. madre}$$

$$10 \text{ ml} \times \frac{8 \text{ mg}}{11} \times \frac{11}{40 \text{ mg}} = 2 \text{ ml de la dis. madre}$$

$$10 \text{ ml} \times \frac{6 \text{ mg}}{11} \times \frac{11}{40 \text{ mg}} = 1,5 \text{ ml de la dis. madre}$$

$$10 \text{ ml} \times \frac{4 \text{ mg}}{11} \times \frac{11}{40 \text{ mg}} = 1 \text{ ml de la dis. madre}$$

$$10 \text{ ml} \times \frac{2 \text{ mg}}{11} \times \frac{11}{40 \text{ mg}} = 0.5 \text{ ml de la dis. madre}$$

Para dibujar la recta patrón se necesita saber la longitud de onda máxima a la que realizar las lecturas de absorción, así que si realizamos un espectro de cualquier muestra obtenemos:

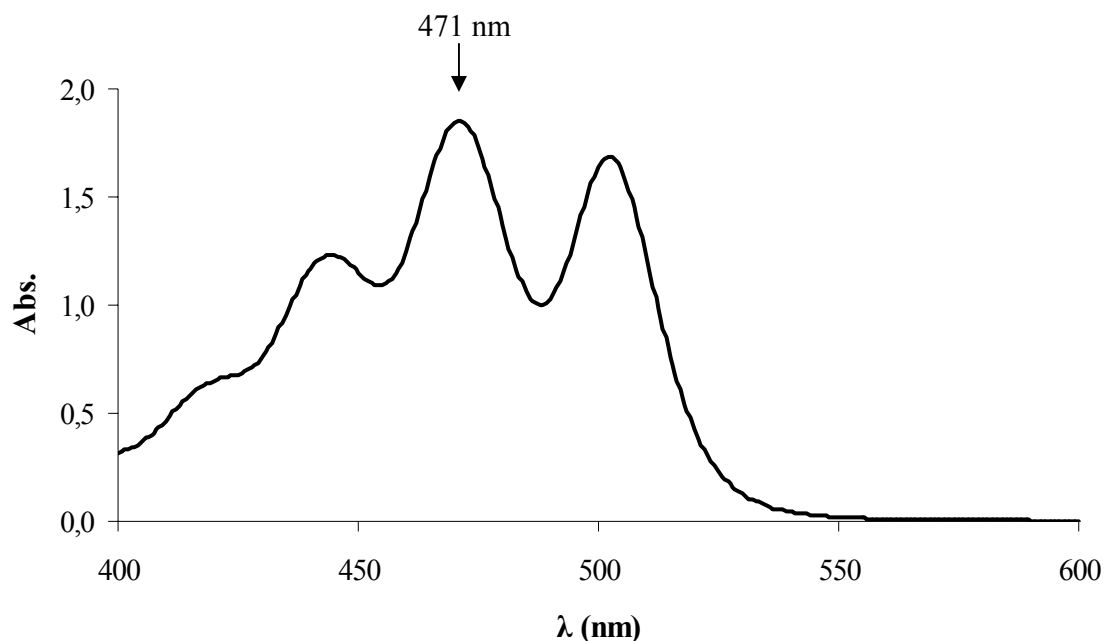


Figura 7.20. Espectro del licopeno

Siendo el pico más alto a 471 nm, que será la longitud de onda máxima a la cual deben ser leídas las muestras patrón para dibujar la recta.

Se prepara el espectrofotómetro con los valores que se precisan en la tabla 7.1:

λ (nm)	471
Multipuntos	5
Pasar por:	0
Orden	1
Unidades de medida	ppm

Tabla 7.1. Datos espectrofotómetro

La lectura del espectrofotómetro es la siguiente:

Nº	Concentración (ppm)	Absorbancia
1	2	0,389
2	4	0,736
4	8	1,474
5	10	1,860

Tabla 7.2. Patrones

Como el punto que corresponde a la concentración de 6ppm era el que más se alejaba de la recta, lo obviamos para obtener mayor exactitud.

La ecuación de la recta obtenida es: $A = 0,1854 [C]$

Con una $r^2 = 0,9998$.

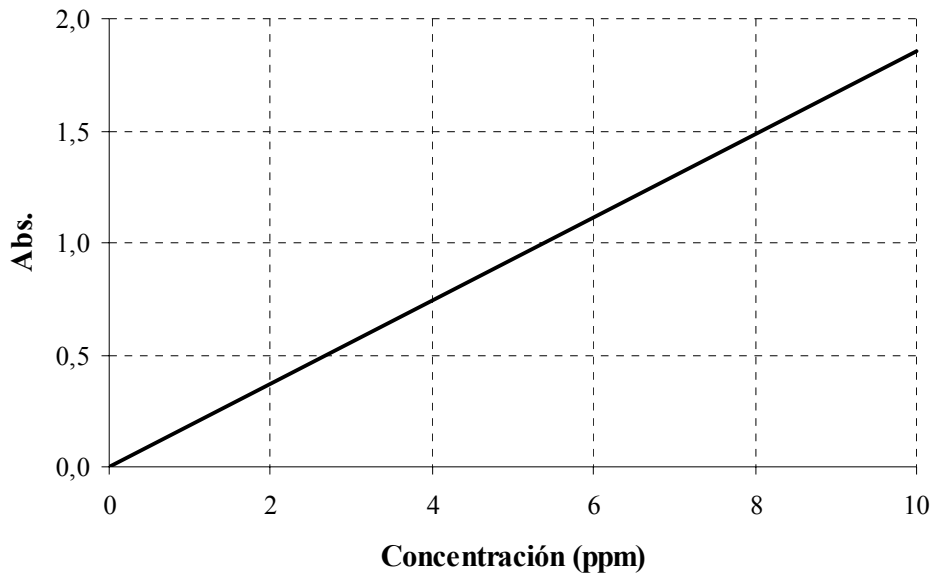


Figura 7.21. Recta de calibrado

En la figura 7.21 se muestra la recta patrón que permitirá hallar las concentraciones de nuestras muestras problema a partir de las lecturas de la absorbancia en el espectrofotómetro para obtener la concentración.

7.2.6. Cálculos y resultados

Cálculo del factor de retención (R_f) de la muestra patrón.

Realizamos unas cuantas medidas sobre la placa de TLC para obtener la media de todas ellas. Para calcular el factor de retención se mide desde el origen donde hemos aplicado el capilar hasta la mitad del punto desplazado. Y se divide por la distancia que va desde la base hasta el frente del disolvente (lo máximo que ha subido el solvente). (Figura 7.22)

Distancia S	Distancia P	R_f licopeno
14,6	1,90	0,13
14,6	1,90	0,13
14,6	2,05	0,14
14,6	2,10	0,14
14,6	2,10	0,14
14,6	2,10	0,14
14,6	2,10	0,14
14,6	2,10	0,14
14,6	2,10	0,14
14,6	2,05	0,14
14,0	1,95	0,14
14,0	1,95	0,14
14,0	2,00	0,14
14,0	2,00	0,14
14,0	2,10	0,15
14,0	2,10	0,15
14,0	2,15	0,15
14,0	2,20	0,16
14,0	2,10	0,15

Tabla 6.3. Factor de retención licopeno

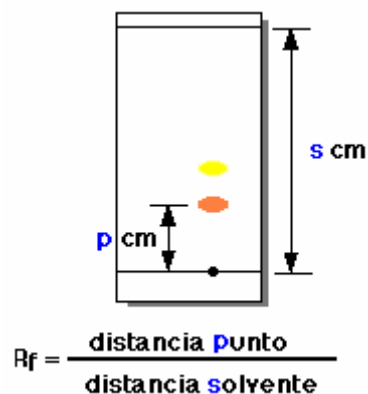


Figura 7.22. Relación del factor de Retención

Nº de muestras	ΣR_f	$\bar{X} R_f$ licopeno
18	2,59	0,14

7.2.6.1. Elección de la variedad de tomates para realizar las pruebas

Escogemos diferentes tipos de tomate para ver cual de ellos tiene mayor cantidad de licopeno.

- Tomate de rama
- Tomate de pera
- Tomate cherry
- Tomate raf
- Tomate frito
- Tomate triturado

Para cada uno de los tomates haremos el mismo proceso que en el apartado.

Calcularemos el factor de retención (R_f) de las bandas que se han formado durante el desarrollo de la placa de TLC de los diferentes tomates.

$$R_{f \text{ rama}} = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el eluyente}} = \frac{1,3}{10,5} = 0,12$$

$$R_{f \text{ pera}} = \frac{0,7}{10,5} = 0,067$$

$$R_{f \text{ cherry}} = \frac{1,1}{9,7} = 0,113$$

$$R_{f \text{ raf}} = \frac{0,8}{10} = 0,08$$

$$R_{f \text{ frito}} = \frac{2,7}{9,2} = 0,29$$

$$R_{f \text{ triturado}} = \frac{1,5}{14,8} = 0,10$$

7.2.6.1.1. TOMATE DE RAMA

	Rama 1	Rama 2
Forma	cuadraditos	cuadraditos
g tomate	20,06	20,02
ml acetona 1ª vez	100	100
Tiempo 1 (min.)	10	10
T° 1	ambiente	ambiente
Agitador	magnético	magnético
ml acetona 2ª vez	50	50
Tiempo 2 (min.)	10	10
T° 2	ambiente	ambiente
ml acetona 3ª vez	51	50
Tiempo 3 (min.)	10	10
T° 3	ambiente	ambiente
ml extracto	190	190
ml hexano	190	190
ml agua destilada	100	100
rotor T°	38-40	38-40
Disolvente balón	DCM + EdP 50%	DCM + EdP 50%
Disolvente TLC	EdP + DCM 5%	EdP + DCM 5%
Tiempo TLC (min.)	20	20
R_f	0,12	0,12
Disolvente UV-Vis	hexano	hexano
Absorbancia	0,784	1,122
Concentración	4,227	6,053

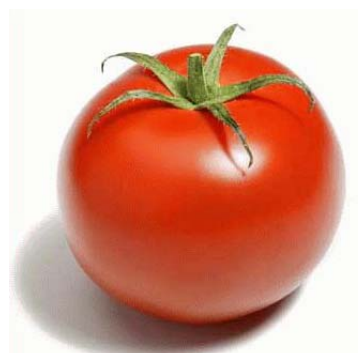


Tabla 7.4. Procedimiento de separación del licopeno del tomate en rama

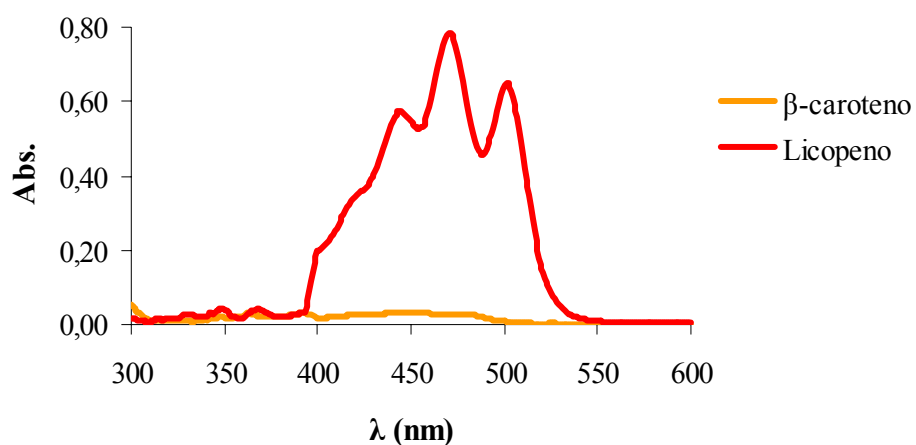


Figura 7.23. Espectros del tomate rama

7.2.6.1.2. TOMATE DE PERA

	Pera 1	Pera 2
Forma	cuadraditos	cuadraditos
g tomate	20,02	20,04
ml acetona 1ª vez	100	100
Tiempo 1 (min.)	10	10
T° 1	ambiente	ambiente
Agitador	magnético	magnético
ml acetona 2ª vez	50	50
Tiempo 2 (min.)	10	10
T° 2	ambiente	ambiente
ml acetona 3ª vez	50	50
Tiempo 3 (min.)	10	10
T° 3	ambiente	ambiente
ml extracto	190	194
ml hexano	190	194
ml agua destilada	100	100
rotor T°	38-40	38-40
Disolvente balón	DCM + EdP 50%	DCM + EdP 50%
Disolvente TLC	EdP + DCM 5%	EdP + DCM 5%
Tiempo TLC (min.)	20	20
R_f	0,067	0,083
Disolvente UV-Vis	hexano	hexano
Absorbancia	0,573	0,878
Concentración (ppm)	3,093	7,7377



Tabla 7.5. Procedimiento de separación del licopeno del tomate pera

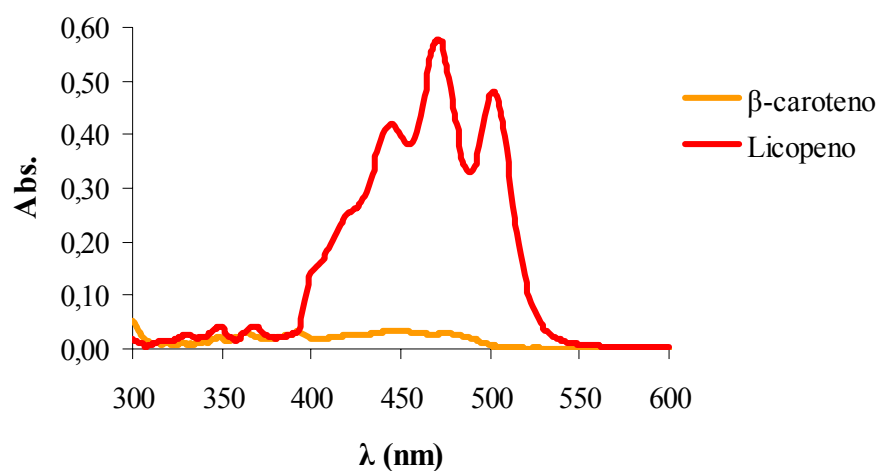


Figura 7.24. Espectros del tomate pera

7.2.6.1.3. TOMATE CHERRY

	Cherry 1	Cherry 2
Forma	cuadraditos	cuadraditos
g tomate	20	20
ml acetona 1ª vez	100	100
Tiempo 1 (min.)	10	10
T° 1	ambiente	ambiente
Agitador	magnético	magnético
ml acetona 2ª vez	50	50
Tiempo 2 (min.)	ambiente	ambiente
ml acetona 3ª vez	50	50
Tiempo 3 (min.)	10	10
T° 3	ambiente	ambiente
ml extracto	188	168
ml hexano	188	168
ml agua destilada	100	100
rotor T°	38-40	38-40
Disolvente balón	DCM + EdP 50%	DCM + EdP 50%
Disolvente TLC	EdP + DCM 5%	EdP + DCM 5%
Tiempo TLC (min)	20	20
R_f	0,113	0,103
Disolvente UV-Vis	hexano	hexano
Absorbancia	0,46	0,514
Concentración (ppm)	2,4811	2,7706



Tabla 7.6. Procedimiento de separación del licopeno del tomate cherry

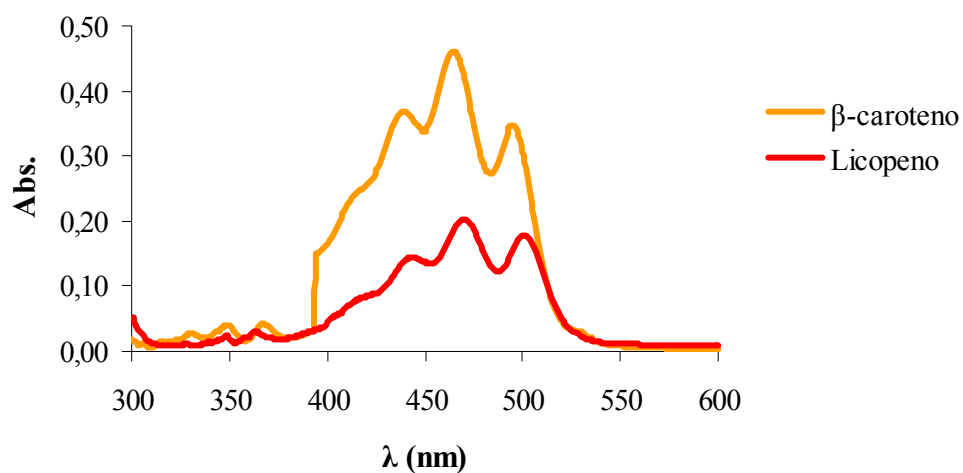


Figura 7.25. Espectros del tomate cherry

7.2.6.1.4. TOMATE RAFF

	Raf 1	Raf 2
Forma	cuadrados	cuadrados
g tomate	20,03	20,03
ml acetona 1ª vez	100	100
Tiempo 1 (min.)	10	10
T° 1	ambiente	ambiente
Agitador	magnético	magnético
ml acetona 2ª vez	50	50
Tiempo 2 (min.)	10	10
T° 2	ambiente	ambiente
ml acetona 3ª vez	50	50
Tiempo 3 (min.)	10	10
T° 3	ambiente	ambiente
ml extracto	214	174
ml hexano	214	174
ml agua destilada	100	100
rotor T°	38-40	38-40
Disolvente balón	DCM + EdP 50%	DCM + EdP 50%
Disolvente TLC	EdP + DCM 5%	EdP + DCM 5%
Tiempo TLC (min.)	20	20
R _f	0,08	0,09
Disolvente UV-Vis	hexano	hexano
Absorbancia	0,474	0,749
Concentración (ppm)	2,5555	4,0420



Tabla 7.7. Procedimiento de separación del licopeno del tomate raf

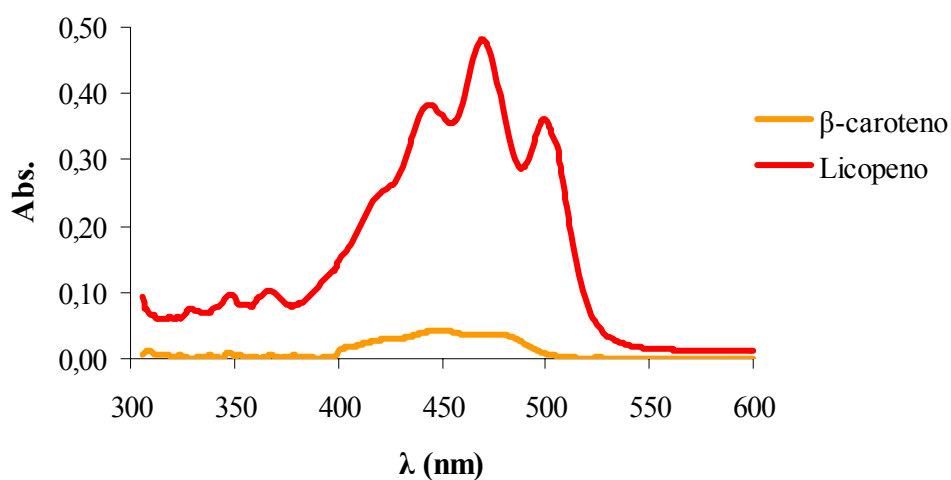


Figura 7.26. Espectros del tomate raf

7.2.6.1.5. TOMATE FRITO

	Frito 1	Frito 2
Forma	líquido	líquido
g tomate	19,95	20,20
ml acetona 1ª vez	50	50
Tiempo 1 (min.)	10	10
T° 1	ambiente	ambiente
Agitador	magnético	magnético
ml acetona 2ª vez	50	50
Tiempo 2 (min.)	10	10
T° 2	ambiente	ambiente
ml acetona 3ª vez	50	50
Tiempo 3 (min.)	10	10
T° 3	ambiente	ambiente
ml acetona 4ª vez	50	50
Tiempo 4 (min.)	10	10
T° 4	ambiente	ambiente
ml extracto	185	180
ml hexano	185	180
ml agua destilada	100	100
rotor T°	38-40	38-40
Disolvente balón	DCM + EdP 50%	DCM + EdP 50%
Disolvente TLC	EdP + DCM 5%	EdP + DCM 5%
Tiempo TLC (min.)	20	20
R_f	0,29	0,23
Disolvente UV-Vis	hexano	hexano
Absorbancia	0,499	0,204
Concentración (ppm)	2,6931	1,1028



Tabla 7.8. Procedimiento de separación del licopeno del tomate en frito

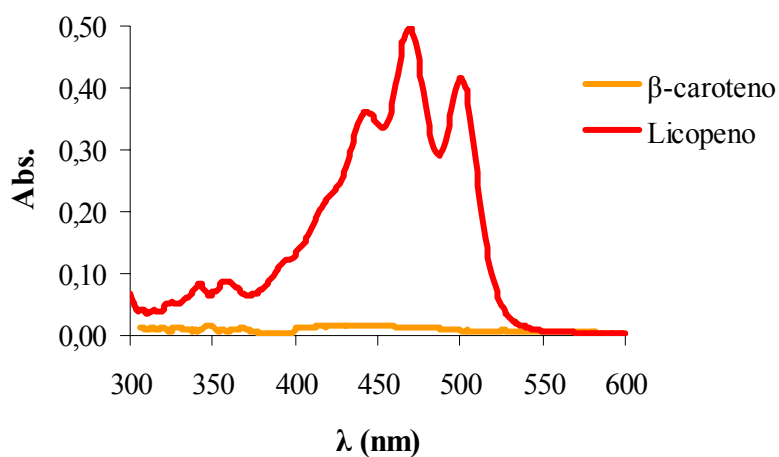


Figura 7.27. Espectros del tomate frito

7.2.6.1.6. TOMATE TRITURADO

	Triturado 1	Triturado 2
Forma	líquido	líquido
g tomate	20,11	20,11
ml acetona 1ª vez	50	50
Tiempo 1 (min.)	10	10
T° 1	ambiente	ambiente
Agitador	magnético	magnético
ml acetona 2ª vez	50	50
Tiempo 2 (min.)	10	10
T° 2	ambiente	ambiente
ml acetona 3ª vez ...	50	50
Tiempo 3 (min.)...	10	10
T° 3...	ambiente	ambiente
ml acetona 8ª vez	50	50
Tiempo 8 (min.)	10	10
T° 8	ambiente	ambiente
ml extracto	160	165
ml hexano	160	170
ml agua destilada	100	100
rotor T°	38-40	38-40
Disolvente balón	DCM + EdP 50%	DCM + EdP 50%
Disolvente TLC	EdP + DCM 5%	EdP + DCM 5%
Tiempo TLC (min.)	60	60
R_f	0,10	0,09
Disolvente UV-Vis	hexano	hexano
Absorbancia	0,348	0,285
Concentración (ppm)	1,8751	1,5367



Tabla 7.9. Procedimiento de separación del licopeno del tomate triturado

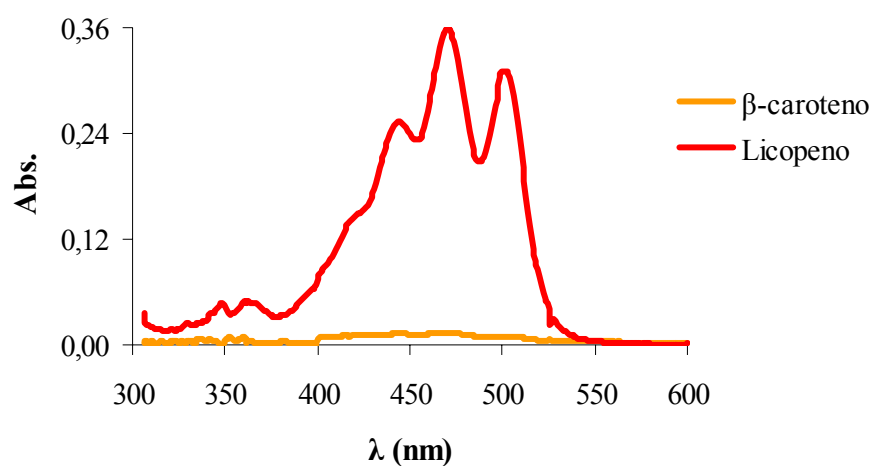


Figura 7.28. Espectros del tomate triturado

Comparamos los miligramos de licopeno de cada tomate y se puede observar que el tomate triturado es el que tiene más cantidad de licopeno, eso puede ser debido a que lleva colorantes añadidos y a que en su extracción es mayor el contacto entre el tomate (licopeno) y la acetona que en el resto, lo extraemos hasta no tener más color el sólido. Luego le sigue el tomate frito, el de pera, el de rama el raf y por último el cherry.

Tipo de tomate	Concentración de licopeno (ppm)	L de hexano	mg/20g tomate
Rama	6,053	0,1	0,6053
Pera	7,738	0,1	0,7738
Cherry	2,771	0,1	0,2771
Raf	4,042	0,1	0,4042
Frito	1,103	2,5	2,7575
Triturado	1,875	2,5	4,6878

Tabla 7.10. Comparación de los mg de licopeno de los diferentes tipos de tomate

7.2.7. Errores cometidos

Hay que tener presente los errores tanto humanos como analíticos que se pueden cometer y acumular:

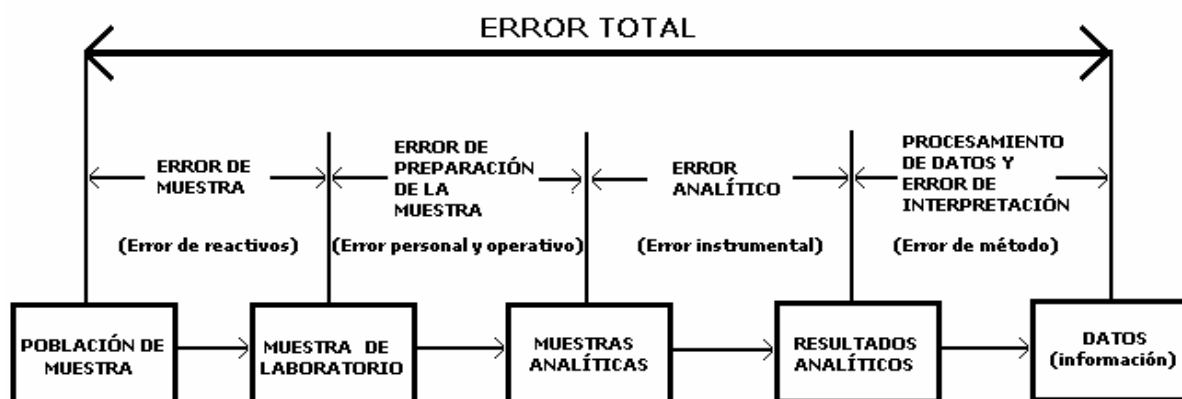


Figura 7.29. Posibles errores

7.2.8. Aplicación del licopeno

El licopeno se va a usar para colorear gelatina (gelatina para repostería y agar-agar) y también cera de vela.

Gelatina de repostería: se coge una lámina de gelatina y la ponemos en remojo con agua hasta pasados unos 5 minutos aproximadamente, mientras tanto calentamos agua caliente. Cuando

empieza ha hervir echamos dentro la gelatina y el licopeno obtenido diluido en etanol, agitándolo continuamente. Al cabo de un rato lo retiramos del fuego y lo ponemos en un vaso, esperamos que coja temperatura ambiente y lo ponemos al congelador durante unas 4 horas aproximadamente, pasadas las 4 horas se observa que ya ha cogido la consistencia de la gelatina y es de color naranja como el licopeno.

Agar-agar: se parece a la gelatina de repostería pero se observa que cuesta más de disolver en agua caliente pero al final se acaba diluyendo. Cuando ya está disuelta toda la gelatina añadimos el licopeno con el etanol y se mezcla un poco más. Lo retiramos del fuego, se deja enfriar y luego lo llevamos a la nevera y a esperar que coja la consistencia a gelatina. (Figura 7.30).

Vela: para colorear la cera de vela lo primero que se hace es derretir la cera incolora al baño maría usando 2 vasos de precipitados. Cuando ya esta derretida añadimos el licopeno, se mezcla un poco más y se pasa a otro vaso con mecha para poder encenderla. Se deja enfriar, y se observa que adquiere un color naranja. (Figura 7.31)



Figura 7.30. Agar-agar



Figura 7.31. Vela

No obstante, al cabo de unos días se denota una diferencia palpable en la intensidad del color en lo que a las gelatinas se refiere, en cambio la coloración de la vela, queda intacta.



Antes



Después

7.2.9. Seguridad en el laboratorio.

7.2.9.1. Normativa general [Véase Anexo IV]

7.2.9.1.1. INFORMARSE

Familiarizarse con los elementos de seguridad del laboratorio (extintores, lavajos, duchas, salidas, etc.).

Leer atentamente las instrucciones antes de hacer un experimento y las etiquetas de seguridad de reactivos y aparatos.

7.2.9.1.2. PROTECCIÓN DE LOS OJOS

Utilizar gafas de seguridad. No usar lentillas.

7.2.9.1.3. VESTIMENTA

Llevar guantes, bata de algodón y gafas de protección.

7.2.9.1.4. PRODUCTOS QUÍMICOS

No utilizar ningún frasco de reactivos al que le falte la etiqueta.

No oler, inhalar, probar o tocar los productos químicos.

No pipetear nunca con la boca.

Utilizar las vitrinas extractoras para manipular productos volátiles.

Ponerse guantes y lavarse las manos a menudo, si se usan productos tóxicos o corrosivos.

No acercar envases de reactivos a una llama.

No calentar en el mechero líquidos inflamables.

Cerrar siempre el mechero Bunsen cuando no se utilice.

7.2.9.1.5. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

Depositar en contenedores especiales y debidamente señalizados:

El vidrio roto.

Los reactivos tóxicos, nocivos o dañinos para el medio ambiente.

Los residuos biológicos.

En ningún caso se arrojarán residuos sólidos al fregadero.

7.2.9.2. Normativa específica

7.2.9.2.1. PROTECCIÓN CONTRA LA OXIDACIÓN

La susceptibilidad de los carotenos a oxidarse no tiene que sobrepasarse. El oxígeno, especialmente en combinación con la luz o el calor, es el factor más destructivo. La presencia de incluso pocas moléculas de oxígeno en muestras guardadas (aunque sea a temperaturas muy bajas) puede rápidamente llevar a la decoloración o a la formación de epóxidos o apocarotenoides. No hay que dejar las muestras expuestas al aire más de lo necesario, especialmente mientras se adsorbe en materiales cromatográficos como las placas de TLC. Las muestras o extractos de carotenos tienen que estar siempre guardadas en una atmósfera inerte (Ar o N₂) o al vacío en completa ausencia de oxígeno. Las soluciones deben estar rociadas con N₂ o Ar durante unos minutos antes de ser guardadas [18].

Al igual que el oxígeno, los agentes oxidantes, como por ejemplo peróxidos que pueden encontrarse en los solventes, causan también una rápida descomposición.

7.2.9.2.2. PROTECCIÓN CONTRA LA LUZ

La exposición de los carotenos a la luz tiene que ser evitado en la medida de lo posible. La luz directa o UV puede causar algunas isomerizaciones *cis/trans* geométricas debido a su gran número de dobles enlaces en la molécula. La luz del día difusa y de baja intensidad o si domina la luz artificial, es aceptable para la mayoría de manipulaciones de los carotenos, pero hay que tomar precauciones para impedir la entrada de luz durante la cromatografía. Así, la cámara de desarrollo para la TLC deberá estar cubierta con un trapo negro o dentro de un armario oscuro.

7.2.9.2.3. EVITAR ÁCIDOS O BASES

Casi todos los carotenos son susceptibles de descomposición, deshidratación o isomerización si están sujetos a condiciones ácidas. Los solventes ácidos hay que evitarlos, incluso aquellos que, como por ejemplo el cloroformo, contiene un mínimo porcentaje de HCl. El vapor de HCl en el aire puede causar su descomposición.

No se deben utilizar reactivos ácidos ni ácidos fuertes en el laboratorio donde se estén manipulando los carotenos.

La mayoría de carotenos son estables a las bases pero algunos, o ciertos compuestos de éstos, se pueden alterar con bases débiles. El trato con las bases, especialmente en la saponificación, debe ser evitado si se sospecha que contiene alguno de estos carotenos o de sus compuestos.

7.2.9.2.4. PUREZA DE SOLVENTES, ADSORBENTES Y REACTIVOS

Los solventes deben estar guardados en botellas herméticas de cristal oscuro. A pesar de que el benceno es un solvente excelente, no se recomienda su uso debido a su toxicidad, y debe ser evitado si es posible; el tolueno que es menos tóxico, normalmente es un sustituto satisfactorio. Las placas de TLC deberían ser pre-lavadas con un solvente al menos tan fuerte en polaridad como el que se va a usar para elución de los carotenos.

Evitar respirar el vapor de hexano, a causa de su neurotoxicidad de algunos de sus metabolitos oxidativos.

Pequeñas cantidades de plastificantes como los ftalatos, se disuelven en solventes orgánicos, y pueden causar un problema de contaminación. Todo contacto de las muestras, solventes, etc. con material de este tipo de plástico debe evitarse.

7.2.9.2.5. TEMPERATURA

Los carotenos pueden sufrir isomerización y modificaciones estructurales si se calientan, tanto sólidos como en solución. Nunca deben estar sujetos a excesivo calor. Debe usarse solventes con bajo punto de ebullición siempre que sea posible, ya que éstos pueden ser eliminados a baja temperatura. Los solventes que se evaporan en un evaporador rotatorio no deben exceder los 40° C de temperatura, nunca por destilación convencional y con cuidado de que no llegue a secarse del todo ya que se produciría la degradación de éstos, especialmente del licopeno; la evaporación del solvente debe finalizar con Nitrógeno o Argón. Se recomienda guardar los cristales y sólidos de la separación en ampollas bajo atmósfera inerte (Nitrógeno o Argón) y guardarlos a -20° C o, si se puede, mejor a -70° C hasta su uso posterior.

7.3. Presupuesto

En la siguiente tabla veremos el presupuesto del material y reactivos que hemos usado para hacer la parte experimental:

Producto	Unidad	Precio (€)
Hexano	4	54,0
Éter de petróleo	2	22,5
Diclorometano	1	26,4
Éter dietílico	1	57,5
Acetona	4	2,7
Licopeno (1 mg)	1	141,0
Caja capilares	1	27,5
Sílica gel 20x20	1	141,0
Nitrógeno	1	211,1
Total	16	683,7

Tabla 7.11. Presupuesto

8. INTERÉS INDUSTRIAL

La producción de los carotenoides a través de la biotecnología esta creciendo en interés. La biotecnología es la tecnología basada en la biología, especialmente usada en agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, ciencias forestales y medicina.

El licopeno con alta pureza, es útil para las industrias farmacéuticas, cosméticas y de alimentos. Conduciendo a un aumento de su utilización en preparados cosméticos, formulas farmacéuticas y fabricación de alimentos funcionales o preparados alimentarios utilizados como complemento de la dieta.

Los productos comerciales se disponen en materia cristalina o en fórmulas tal como soluciones o suspensiones en aceites naturales o estabilizados.

Hasta hace poco tiempo, prácticamente todos los suplementos del licopeno eran extremadamente caros y muchos aún lo siguen siendo. Por ello, cada vez es más habitual la introducción en el mercado de licopeno sintético con un coste mucho más reducido y con unos efectos similares al licopeno natural.

Varias empresas han desarrollado e introducido en el mercado licopeno sintético. Este producto es fácil de procesar, estable y no produce efectos sobre el sabor de los alimentos a los que se le aplica.

El licopeno sintético ha sido reconocido por paneles de expertos externos como productos GRAS (Generally Regarded As Safe), reconocimiento que se espera sea otorgado por la FDA. Así pues, pueden ser utilizados de forma segura en diferentes alimentos y bebidas para fortificar sus propiedades nutritivas. El producto está disponible en diferentes formatos, como polvo (LycoVit 10% figura 7.1.) para bebidas y alimentos; disperso (LycoVit Dispersión 20%) para el enriquecimiento de los alimentos y suplementos dietéticos.



Figura 7.1. LycoVit 10%

La producción a gran escala de licopeno se basa en su extracción, aislamiento y purificación a partir de fuentes naturales, siendo primordial obtenerlo en forma cristalina con tamaño inferior a 10 μm . Se usa la tecnología de los fluidos supercríticos.

8.1. Extracción con fluidos supercríticos

Las tecnologías actuales para la obtención de extractos alimentarios generalmente utilizan solventes orgánicos, que comportan un riesgo debido a su toxicidad, a su poder inflamable y a los residuos que generan. Rastros de los extractantes pueden contaminar el producto final, haciéndolo no adecuado para el uso farmacéutico o cosmético (también es indeseable en industrias de pigmentos, donde es necesaria una alta pureza de los productos). Por eso se están desarrollando nuevas tecnologías más respetuosas con el medio ambiente, que no representan ningún riesgo para la salud y que garanticen una calidad superior de los productos.

La extracción con CO_2 supercrítico está implantada a escala comercial en la obtención de aromas y sabores de especies y hierbas aromáticas, y en la descafeinización. Además, hay procesos que se encuentran en fase de expansión, como obtención de bebidas sin alcohol, productos animales sin colesterol y aceites de semillas. [43]

El CO_2 se ha convertido en el fluido ideal supercrítico en la industria alimentaria debido a sus características: su temperatura crítica es 31,06° C, su presión crítica 73,83 bares y su densidad crítica 0,460g/cm³. Las ventajas que ofrece el CO_2 respecto los solventes orgánicos convencionales justifica el uso de este fluido en el procesado de alimentos para obtener una extracción excelente y un producto final óptimo. El CO_2 no es tóxico, ni inflamable, no contamina, es completamente recuperable, económico e inerte y sus condiciones críticas son relativamente seguras y fáciles de conseguir, haciéndolo apropiado para la extracción de compuestos.

Es posible extender y modificar la selectividad y la solubilidad de compuestos en dióxido de carbono adicionando co-solventes o adsorbentes.

Un co-solvente tiene una volatilidad intermedia entre el fluido supercrítico (FSC) y el compuesto a extraer. Es miscible con el fluido supercrítico y constituye un pequeño porcentaje de la composición total del fluido. Puede mejorar la selectividad y la solubilidad del soluto por interacciones físicas con el solvente (incrementando la densidad) como también por interacciones químicas específicas con el soluto (por puentes de hidrógeno). No obstante, algunos sistemas de co-solventes, presentan dificultades a la hora de separar el co-solvente del producto después de la extracción [55].

Las ventajas de la extracción supercrítica (ESC) respecto a otros procesos convencionales como la extracción con solventes y separación mediante destilación son la automatización (reducción de pasos operacionales), seguridad en las operaciones debido al uso de solventes no orgánicos y el uso de temperatura moderada en el rango crítico favorable para no llegar hasta su descomposición. La principal ventaja de los FSC es la excelente calidad del producto resultante.

La desventaja de la ESC al principio de su uso, es la inversión del coste de su implantación en la industria de la alimentación. No obstante, en los años 70 este coste fue compensado por el establecimiento de varias plantas comerciales para la descafeinización del café a presiones altas, produciendo un extracto valioso y útil (la cafeína) así como un buen refinado (descafeinado del grano de café).

El desarrollo del éxito comercial implica el proceso de un producto de alta calidad, un proceso de extracción relativamente simple, que finalmente ha llegado a niveles de expansión que estaban inicialmente previstos para la ESC. Pero por otro lado la aplicación de la ESC, requiere una investigación intensiva, ya que a diferencia de las técnicas convencionales de extracción, los FSC no son una tecnología establecida que se pueda aplicar directamente a cada producto.

La industria de los sabores, fragancias y colorantes es un campo de aplicación de ESC que se ha desarrollado considerablemente y que actualmente tiene plantas de extracción en varios países. Concretamente, los colorantes es el tema que nos concierne, dado el creciente interés que existe en usar colorantes naturales, especialmente considerando los elevados precios que estos productos aportan al mercado.

Los antioxidantes naturales producidos por la ESC también son de alto interés para la industria alimentaria porque no alteran el aroma, sabor o color de los comestibles. Están muy dispersos puesto que son muy solubles y no se evaporan durante su cocinado, a diferencia de otros antioxidantes sintéticos.

Los fluidos supercríticos son muy sensibles a pequeños cambios de temperatura y presión en la región crítica, y esta propiedad ofrece la posibilidad de controlar el tamaño y la morfología de las partículas en un rango amplio, con tan sólo un pequeño ajuste en las condiciones del proceso.

8.2. Fundamento de la extracción

La extracción con fluidos supercríticos (ESC) es una operación de transferencia de materia efectuada en condiciones de presión y temperatura superiores a las críticas del disolvente. Esta operación se basa en la capacidad que tienen determinados fluidos en estado supercrítico (FSC) de modificar su poder disolvente y en sus peculiares propiedades físico-químicas.

El poder disolvente de los FSC puede ser elevado, dependiendo de las condiciones de presión y temperatura aplicadas que permitan la disolución selectiva de sustancias determinadas en el FSC. Los disolventes se recuperan fácilmente, debido a las características de transferencia de materia de los fluidos supercríticos que se separan de las sustancias seleccionadas. La extracción se realiza variando las condiciones de presión y temperatura de los FSC.

8.2.1. Condiciones de operación de los fluidos supercríticos

Los fluidos supercríticos son líquidos o gases en condiciones ambientales, llevados a unas condiciones operativas de presión elevada y temperatura moderada, por encima de su punto crítico. Su propiedad más importante es el poder disolvente en estado supercrítico, esto es,

como son altamente compresibles, especialmente cerca del punto crítico, los solutos exhiben variaciones muy pronunciadas en su solubilidad según las condiciones de extracción.

El proceso de los FSC consiste en dos pasos básicos: extracción y separación. El material a extraer se coloca en un extractor junto con el fluido supercrítico a unas condiciones de presión y temperatura específicas.

Para materiales sólidos, la extracción suele realizarse en discontinuo y para líquidos ésta puede ser en continuo. Después de la extracción, el fluido y componente extraído se pasan a través de un separador y reduciendo la presión y/o variando la temperatura, el poder disolvente del fluido supercrítico se reduce y se separa o se fracciona el componente.

Generalmente basta reducir suficientemente la densidad bajando la presión para lograr una separación adecuada. La extracción fraccionada de productos naturales se efectúa generalmente a 60° C, con una presión inicial de 60 bar hasta llegar a presiones entre 300 y 350 bars.

En la figura 8.1 aparecen tres regiones diferenciadas que corresponden a los tres estados de la materia; están separados por líneas que representan los equilibrios sólido-sólido o de fusión, sólido-gas o de sublimación y líquido-gas o de vaporización. El cambio entre fases se consigue variando la presión y/o temperatura. También aparecen dos puntos característicos: el punto triple, donde coexisten los tres estados, y el punto crítico, al final de la curva de vaporización, caracterizado por una presión crítica, P_c , y una temperatura crítica, T_c . Así pues, un FSC es una sustancia que se encuentra en condiciones de presión y temperatura superiores a su presión y temperatura críticas.

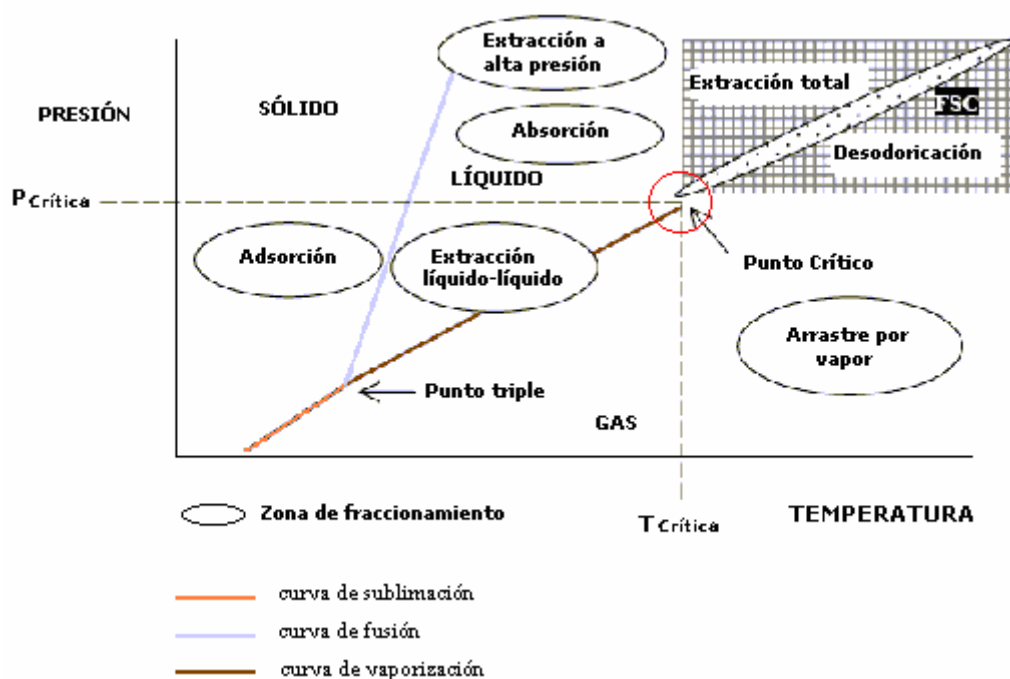


Figura 8.1. Esquema representativo del diagrama de presión-temperatura de los estados de la materia

En el punto crítico dejan de existir las fases líquida y gaseosa como tales para dar lugar a una nueva fase (fase supercrítica) en otra región distinta (la región supercrítica). Esta nueva fase que ha aparecido tiene un poder disolvente que puede ser bajo o alto, sin que se produzca un cambio de fase, sólo realizando pequeñas variaciones de presión y temperatura.

8.2.1.1. La densidad. El poder disolvente de los fluidos supercríticos.

El poder disolvente de una sustancia pura depende en gran parte de su densidad.

La densidad de los FSC puede ser modificada de forma continua; por lo tanto también se puede modificar su poder disolvente, simplemente variando moderadamente la presión y la temperatura, ya que en el proceso no se producen cambios de fase.

Al aumentar isotérmicamente la presión partiendo de una temperatura inferior a la crítica y una presión baja, la densidad aumenta siguiendo una variación típica en los gases hasta un punto en que se produce un cambio de fase sin que se modifiquen las condiciones de presión y temperatura, de manera que la densidad cambia bruscamente de un valor bajo propio de los gases a un valor alto típico de los líquidos. A partir de entonces son necesarios enormes aumentos de la presión para conseguir sólo pequeños cambios de la densidad, comportamiento normal de los líquidos [38].

En cambio, si se parte de una temperatura superior a la crítica, el aumento isotérmico de la presión produce un aumento de la densidad, desde valores bajos propios de los gases hasta valores altos típicos de los líquidos, sin que se produzca ningún cambio de fase.

De hecho, es de gran importancia si se considera que el poder disolvente de cada sustancia pura depende de su densidad, puesto que es una función de las fuerzas intermoleculares resultantes del empaquetamiento de las moléculas del disolvente alrededor del soluto, fuerzas que a su vez dependen de la densidad. De esta forma, el poder disolvente de los FSC puede ser bajo (como el de los gases) o puede ser alto (como el de los líquidos) dependiendo de la presión y temperatura.

Es más, el poder disolvente de los FSC puede ser modificado de forma continua (puesto que lo puede ser su densidad) desde valores altos, simplemente variando la presión o la temperatura, puesto que en el proceso no se producen cambios de fases. Este hecho puede ser utilizado para aumentar la selectividad de los FSC y desde luego lo es para realizar el fraccionamiento de solutos múltiples por reducción paulatina de la densidad del disolvente.

Las condiciones de presión y temperatura más adecuadas para conseguir todos estos efectos son aquellas que quedan próximas al punto crítico (zona sombreada de la figura 8.1.) puesto que ésta es la zona donde se producen las mayores variaciones de la densidad del FSC, y en consecuencia de su poder disolvente, con los cambios más pequeños de presión y temperatura.

8.2.1.2. Viscosidad y difusividad. Transferencia de materia.

Además de estas características peculiares respecto a la densidad y el poder disolvente, los FSC presentan otras propiedades físicoquímicas singulares que contribuyen a que sean unos disolventes especiales. Estas propiedades, que inciden directamente sobre la velocidad y capacidad de transferencia de materia y que permite una extracción rápida y eficaz del extracto, vienen definidas por la viscosidad y difusividad.

Es importante el factor de poder de penetración basado en la elevada transferencia de masa de los solutos en el fluido. Una baja viscosidad y una alta difusividad del fluido supercrítico aumentan esta propiedad permitiendo una extracción eficiente de los componentes de la materia prima.

Los FSC mantienen una densidad comparable con la de los líquidos, pero con valores de viscosidad y difusividad próxima a las de los gases. Como consecuencia, los FSC tienen un poder disolvente similar al de los líquidos pero con características de transferencia de materia mucho mejores. De esta forma, las eficacias alcanzadas en las separaciones con FSC han de ser apreciablemente mayores que las conseguidas en la extracción convencional con disolventes líquidos.

La solubilidad de una sustancia no volátil en distintos FSC y condiciones dadas de presión y temperatura aumenta con la T_c del FSC, aunque se deben considerar los efectos de la densidad y polaridad de este último. La volatilidad de los solutos aumenta con la temperatura.

El poder solvente de los FSC se puede relacionar directamente con su densidad, que aumenta a medida que la presión aumenta o la temperatura disminuye.

La transferencia de materia de los FSC es elevada, cosa que permite una extracción rápida y eficaz del extracto. Ésta viene definida por dos propiedades: la viscosidad y la difusividad.

El campo de disolventes que se pueden utilizar en la ESC cubre un amplio intervalo de temperaturas de operación, y varía considerablemente a medida que la polaridad y el tamaño de estos fluidos varíen.

El compuesto químico más utilizado en la industria alimentaria es el CO_2 porque presenta propiedades químicas más asequibles.

8.2.2. **Planta de extracción**

- **Extractor:** es el recipiente donde se mezclan la materia prima y el FSC, en unas condiciones determinadas de temperatura, presión, flujo y tiempo de contacto o de equilibrio. Éste tiene que ser capaz de resistir elevadas presiones de operación (hasta 500 bar) y debe hacer posible la recirculación del FSC. El FSC sale junto con el extracto hacia el separador.
- **Separador:** es donde se modifican las condiciones de operación respecto al extractor; normalmente se reduce la presión para disminuir el poder disolvente del FSC y así el extracto y el FSC quedan separados.

- **Compresor:** utilizado cuando es necesario recuperar el CO₂ y en procesos discontinuos en que se presuriza y despresuriza continuamente. Generalmente viene después de la fase de separación entre el extracto y FSC incrementando la presión del FSC por encima de su punto crítico para poder introducirlo de nuevo al extractor.
- **Bombas:** elementos de control que controlan todos los flujos de trabajo, modificando las presiones y velocidades de circulación de los fluidos.
- **Equipos de control y seguridad:** existen básicamente en una planta de alta presión y temperatura para asegurar un buen funcionamiento de la instalación, para evitar accidentes, facilitar la tarea de operarios y obtener un rendimiento máximo del equipo.

8.2.3. Procesos de extracción

Existen 2 tipos:

- **Extracción discontinua o por cargas:** se realiza en procesos de extracción sólido-fluido donde el sólido es la materia prima para la extracción. El procesamiento de sólidos sólo se puede realizar por carga y descarga, sin posibilidad de flujo continuo. Aunque cabe la posibilidad de hacerlo en semicontinuo colocando diversos extractores en serie con cargas y descargas alternativas. El proceso de extracción se desarrolla en los extractores, donde se carga la materia prima y se introduce el fluido supercrítico en las condiciones de temperatura y presión fijadas. Después de un tiempo de contacto cuando ya se alcanza el equilibrio entre las fases y se abren las válvulas de salida, en el extractor queda la materia prima como refinado. La mezcla del extracto deseado más el FSC se conduce al separador y mediante una descompresión se separan totalmente, ya que el FSC pierde drásticamente su poder disolvente.
- **Extracción continua o de flujo:** se realiza en procesos de extracción líquido-líquido, donde la materia prima que se ha de extraer está en fase líquida. Con este sistema se eliminan los tiempos muertos de carga y descarga, la presurización y despresurización, y por lo tanto, el procedimiento es más eficaz y rápido.

El proceso de extracción se realiza bombeando continuamente materia prima y FSC a contracorriente, que quedan en contacto el tiempo necesario para separar el componente que se desea. El extracto queda solubilizado por el FSC, salen juntos del extractor y se expanden, y a través de una válvula de descompresión se reduce el poder disolvente del FSC, hecho que origina la precipitación del extracto en el separador, donde se retira sin residuos de disolvente ya que ésta se evapora. El FSC se recomprime y se envía de nuevo al extractor, de forma que es reciclado.

8.3. El dióxido de carbono como fluido supercrítico

8.3.1. Características y propiedades

El dióxido de carbono es un gas a temperatura ambiente, incoloro, con débil olor y sabor ácido. Es más pesado que el aire y poco soluble en agua y tiene unas características muy valoradas para su uso en la industria alimentaria, ya que no es tóxico, ni corrosivo, ni inflamable y es químicamente inerte.

El CO₂ tiene ventajas añadidas sobre los disolventes orgánicos y los propios FSC para la extracción supercrítica, ya que tiene presión y temperatura críticas accesibles, y baja entalpía de vaporización, es abundante, económico y reciclable.

Se trata de un solvente muy flexible debido a las grandes variaciones en sus propiedades, aún cuando no es un solvente universal. A medida que la presión aumenta, el CO₂ supercrítico es capaz de separar compuestos menos volátiles, de mayor peso molecular, y/o mayor polaridad dentro de aquéllos no polares tales como aceites esenciales, terpenos más pesados y ésteres, ácidos grasos libres, aceites, ceras, resinas y pigmentos (clorofila, carotenos) [22].

Entre otras propiedades cabe destacar:

- Solubilidad baja en agua; se puede utilizar para extraer productos orgánicos de soluciones acuosas
- Volatilidad elevada que permite la separación sin residuos
- Baja viscosidad y grandes coeficientes de difusión, que permiten penetrar y expandirse en la matriz a extraer la sustancia de interés
- Baja entalpía de vaporización, que hace que las necesidades de energía sean bajas
- No es tóxico ni inflamable, ni corrosivo
- Fácil acceso; el CO₂ es abundante y barato
- No producen problemas de contaminación medioambiental

8.3.2. El CO₂ supercrítico: propiedades como disolvente

El CO₂ en estado supercrítico tiene un alto poder disolvente de sustancias apolares o ligeramente polares y de bajo peso molecular; muchas de estas sustancias son precisamente las responsables de los aromas y sabores de los alimentos. Y cuando se recupera la presión atmosférica no tiene propiedades disolventes, ya que se escapa el extracto sin dejar residuo.

Generalmente, el extracto obtenido con CO₂ es de una calidad excelente, ya que como es un gas inerte y utiliza temperaturas de trabajo moderadas, no reacciona con los constituyentes de los alimentos. Eso da un producto extraído donde el aroma, el color, la textura y el sabor no varían apreciablemente sobre el original. Y se consiguen extractos con un grado elevado de pureza.

Las condiciones más frecuentes de aplicación del CO₂ en los procesos de extracción oscilan entre los 40° C y los 80° C de temperatura y entre los 200 y 350 bar de presión, hasta que se agota el extracto.

8.3.3. Ventajas e inconvenientes del CO₂ en la extracción supercrítica

➤ Ventajas

- Disolvente excelente de productos naturales
- Rapidez en la extracción agotando prácticamente el extracto de su matriz
- No deja residuo a temperatura ambiente
- Facilidad de recuperación del disolvente y de productos que quedan libres de restos de disolventes
- El producto resulta inalterable y no tiene riesgos de ser tóxico
- Coste bajo de separación, ya que sólo hay que reducir un poco la presión y la temperatura
- Obtención de extractos puros

➤ Inconvenientes

- El CO₂ en estado supercrítico tiene un bajo poder de extracción de componentes muy polares y de peso molecular superior a 400
- La inversión económica inicial es muy elevada, comparada con la extracción convencional
- Se necesita un mantenimiento y una seguridad muy estrictas
- El uso de la tecnología de alta presión requiere una instalación costosa y complicada

La ESC permite, en ciertos casos, ahorros de energía sustanciales respecto a aquellas técnicas de separación convencionales como la extracción o la destilación. Sin embargo, el ahorro en el proceso dependerá marcadamente de la capacidad de recuperar energía o reducir la demanda de energía para comprimir el gas hasta la presión de trabajo.

El uso de mezclas de solventes facilita la selección del solvente adecuado para aplicaciones específicas debido a que la adición de pequeñas cantidades de un solvente orgánico apropiado (una sustancia de volatilidad intermedia) genera fuerzas intermoleculares preferenciales, tales como enlaces de hidrógeno, y aumenta la selectividad del FSC.

Los co-solventes pueden aumentar específicamente el poder solvente del FSC. El uso de mezclas de solventes aumenta la solubilidad de sustancias no volátiles respecto de aquella en FSC puros y acentúa la dependencia de la solubilidad con la temperatura, de modo que los

co-solventes permiten reducir la presión de extracción y posibilitar una eficiente separación soluto/solvente modificando sólo la temperatura. Los co-solventes son muy específicos y permiten aumentar o disminuir los factores de separación de diversas sustancias. El agua y el etanol pueden considerarse como co-solventes ‘naturales’ para productos alimenticios, porque la aplicación de hexano y otros solventes orgánicos para aumentar la solubilidad en CO₂ elimina una de sus ventajas más importantes para la industria de alimentos: que su uso no resulta tener riesgos tóxicos.

La ESC también requiere co-solventes polares para incrementar la polaridad del extractante, facilitando así la recuperación del licopeno.

8.4. Aplicaciones comerciales de la extracción supercrítica

Aparte del desarrollo de técnicas de análisis de laboratorio y otras técnicas, existe una serie de aplicaciones de la ESC para las industrias de alimentos, perfumes, fármacos y otras industrias de procesos químicos.

A finales de los años 70 se inició el uso comercial de la ESC para la descafeinización. A partir de entonces, han disminuido tanto los costos de inversión como los de operación para plantas de extracción a altas presiones, y han aumentado las regulaciones de uso para los solventes orgánicos convencionales, exigiéndose cada día menores niveles de contaminación con residuos de solventes.

La ESC presenta muchas posibilidades, pero su aplicación todavía tiene un coste demasiado elevado. También hay que considerar que su implementación en la industria será fácil, ya que no hay que etiquetar el producto sometido a este proceso.

8.5. Planta extractora de licopeno

La planta extractora consta de una bomba de membrana de alta presión y una celda de extracción para sólidos conectada a dos celdas para la recuperación de los solutos extraídos. El dióxido de carbono se filtra a través de carbón activo y se condensa mediante un refrigerante de las dos celdas separadoras por lo que es posible establecer las condiciones de presión y temperatura adecuadas para lograr el fraccionamiento selectivo de licopeno y otros carotenos.

En estas condiciones se logra minimizar las reacciones de formación de isomerización y oxidación que provocan la degradación del licopeno. En consecuencia, es posible garantizar una pérdida mínima de bioactividad del licopeno durante el procedimiento de extracción y obtener así, el isómero más estable del licopeno (forma *todo-trans*).

El trabajo realizado previamente sobre la utilidad de los fluidos supercríticos para la extracción del licopeno se ha centrado en los extractos obtenidos con disolventes líquidos.

Las características de este método de extracción de licopeno son adecuadas para su uso a escala preparativa en aplicaciones farmacéuticas, industria cosmética y en alimentación. Una de las ventajas para la implementación industrial es el hecho de utilizar bajas temperaturas para minimizar la isomerización *trans-cis* lo que permite reducir los costes energéticos del proceso.

La extracción mediante CO₂ del licopeno ha sido descrita por algunos autores con unos resultados reproducibles pobres debido a la degradación y/o isomerización del licopeno durante la extracción. Para resolver este problema, se usan aceites vegetales como estabilizadores que algunos autores coinciden en llamar co-solventes. A pesar de que diversos autores apuntan a una mejora en la eficiencia de extracción en presencia de algunos de estos aceites vegetales, no queda claro si su efecto sólo es protector contra la degradación o también facilitan la extracción [58].

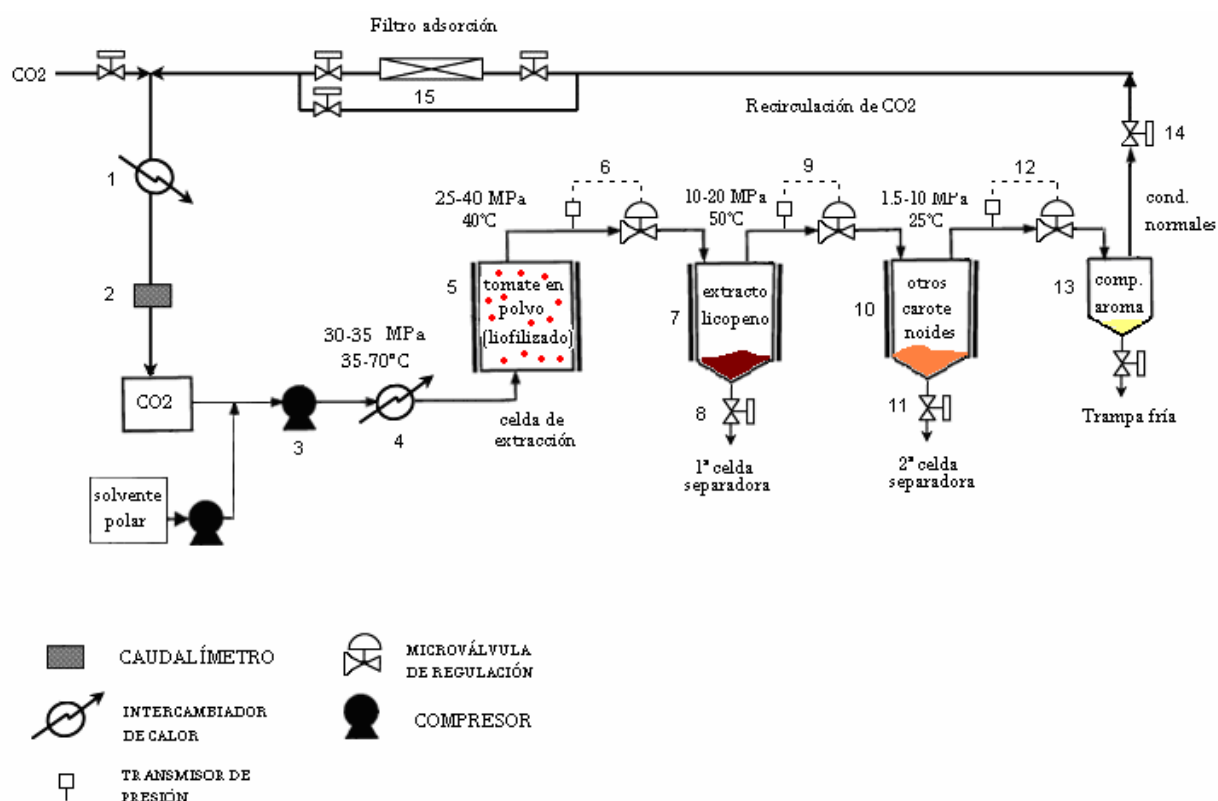


Figura 8.2. Diagrama de flujo, planta piloto de extracción del licopeno del tomate

8.5.1. Funcionamiento y puesta en marcha

8.5.1.1. Pretratamiento

Cada año, millones de toneladas de tomates son destruidos y grandes cantidades de subproductos provenientes de la industria agroalimentaria son eliminados en forma de desecho.

El 40% de la materia bruta del tomate, se emplea sobretodo en la elaboración de productos alimenticios como salsa de tomate o productos de conserva entre otros, con lo cual la piel y las semillas principalmente, son eliminadas en forma de residuos en el curso de su fabricación.

En esta planta se prevé tratar estos residuos de tomates, los cuales contienen todavía un alto valor nutritivo, en vez de emplearlos en la alimentación animal o tirarlos con el consecuente ahorro de dinero y mejora en la gestión medioambiental.

Para ello primero hay que eliminar las impurezas residuales contenidas en estos deshechos con un lavado con agua y posteriormente se liofilizará para facilitar la reducción del volumen y como consecuencia conseguir un considerable ahorro energético.

8.5.1.2. Liofilización (o tomate deshidratado al sol)

Con esta técnica conseguimos partículas muy finas y como consecuencia una mayor transferencia de masa ya que incrementamos el contacto entre el sólido y la fase fluida. Lo ideal es conseguir sólo el 6% de humedad y una partícula de tamaño de 1 mm.

8.5.1.3. Proceso

Se desea obtener un tamaño de partícula de máximo 10 μm y una pureza superior al 85% para poder ser utilizado en la industria de alimentos.

Esta planta (figura 8.2.) está diseñada para el tratamiento en discontinuo de licopeno. El CO_2 supercrítico es filtrado y bombeado a las condiciones de operación del extractor, esto es entre 30-35 MPa de presión y 35° C -70° C de temperatura. Después de la extracción, el disolvente ahora cargado con el extracto, se separa de la fase refinada. Un proceso de despresurización en tres etapas, mediante microválvulas de regulación, separa el extracto del disolvente. El extracto se recoge en los separadores. El CO_2 abandona el sistema y pasa por el filtro de adsorción de carbón activo para su recirculación.

Se introduce el producto a extraer en la celda de extracción de capacidad 16 l, en este caso el tomate liofilizado con alto contenido en licopeno. Se hace pasar el gas CO_2 a través de un compresor (3) para que llegue a la presión de extracción deseada, entre 30 y 35 MPa. Seguidamente, pasa por un intercambiador (4) de calor con el fin de calentar el gas comprimido hasta la temperatura de extracción que estará entre 35 y 70° C. Éste llega a la celda de extracción (5) donde se pone en contacto con las células del tomate liofilizado. El fluido supercrítico sale cargado con los compuestos lipídicos hasta la 1ª celda separadora (7) de capacidad 2 l donde se disminuye la presión de 10 a 20 MPa regulada por la microválvula de regulación (6). Según la composición inicial de los carotenoides, también se puede variar la temperatura tanto aumentándola como disminuyéndola. Estos cambios de presión y temperatura produce una disminución de la densidad del fluido supercrítico que provoca la precipitación de algunos componentes originándose dos fracciones: una sólida de color rojo intenso que corresponderían a los cristales del *todo-trans* licopeno y otra cargada con el resto de los pigmentos, otros lípidos y componentes del aroma. Esta última fracción es conducida hasta la 2ª celda separadora (10) de capacidad de 2 l como la 1ª, en la que sigue disminuyendo la presión hasta 1,5-10 MPa a través de otra microválvula de regulación (9), a la vez que se disminuye la temperatura. Estas variaciones vuelven a provocar la separación y precipitación de los pigmentos del fluido con otros componentes lipídicos de baja volatilidad. Se separan de nuevo dos fracciones: una líquida aceitosa de color rojo-naranja que se deposita en la celda separadora, y otra formada por el gas en condiciones ya subcríticas con los compuestos más volátiles. La fracción que se deposita está formada por carotenoides (mayoritariamente β -caroteno fitoeno y fitoflueno), esteroides y ácidos grasos libres y en menor concentración la luteína, tocoferoles y amirina. El gas con el contenido en volátiles pasa entonces a una trampa

fría (13) de 1 l de capacidad que se encuentra en condiciones normales donde se pueden recuperar.

El CO₂ que se encuentra en condiciones normales de presión y temperatura (14), se recircula y se le hace pasar por un filtro de adsorción de carbón activo (15) para eliminar cualquier impureza; posteriormente pasa por un condensador donde se licua y se retorna a su depósito para su utilización de nuevo.

Las condiciones ideales de trabajo son a 35 MPa, 40° donde se consigue una ρ de 0,96g/cm³. Si variamos en este caso la temperatura y la presión, sólo conseguiremos una variación mínima de la densidad con el consecuente gasto energético. Además, a temperaturas más altas corremos el riesgo de que se produzca la degradación del licopeno [64].

Existe la opción de poder utilizar un co-solvente o no durante el proceso de extracción. El co-solvente contribuye a evitar la degradación del licopeno y contribuye a mantener el pigmento estable durante el tiempo de extracción.

8.5.2. Ventajas de la planta

- Uso de un proceso de nulo impacto ambiental, para la obtención de productos con licopeno, que cumple la normativa vigente en cuanto a las restricciones del uso de disolventes contaminantes y que, por otro lado, responde a la creciente demanda del consumidor hacia productos naturales. [59]
- El empleo de la tecnología de fluidos supercríticos para la producción industrial de licopeno a partir de fuentes económicas y naturales (ej. excedentes y subproductos de tomate) que proporciona una gran oportunidad para la comercialización de alimentos funcionales y de productos con licopeno.
- Obtención de productos de elevada calidad sensorial y beneficiosos para la salud del consumidor al utilizar un proceso que evita la degradación de los carotenoides, ya que la actividad biológica de estos compuestos depende habitualmente de la presencia de un isómero específico.
- Elevada selectividad del proceso de fraccionamiento de licopeno y obtención de extractos muy estables como consecuencia de su reducido potencial de oxidación.

9. NORMATIVA Y LEGISLACIÓN

Los principios que forman las bases de las leyes de la alimentación son similares en todo el mundo, pero las especificaciones varían considerablemente entre países. Esto no es sorprendente, teniendo en cuenta que las expectativas de los países difieren, y las interpretaciones de éstos, en lo que a datos de seguridad se refiere, consienten variaciones considerables.

La unión europea se guía por tres principios

1. Protección de la salud del consumidor
2. Prevención de fraude
3. Eliminar los obstáculos no arancelarios del comercio intracomunitario

Cualquier aditivo alimentario tiene que apoyarse por datos demostrables que presenten que no es dañino para la salud del consumidor, debe ser usado de modo que no engañe al consumidor, y tiene que tener una eficacia tecnológica probada.

El tercer punto fue un tema de mucho esfuerzo cuando la Comunidad Económica Europea (CEE) fue creada en 1957. Se reconoció una necesidad de “harmonización” de las leyes entre varios países, con la conciencia de que cada país tenía sus propias costumbres nacionales, y sociales. La Harmonización se legisló bajo el artículo 100 del Tratado de Roma de 1957.

En 1988 el consejo de las Comunidades Europeas publicó una directiva (frecuentemente referida como “directiva marco”) que otorgó poderes a la comisión Europea a implementar normas para controlar el uso de aditivos alimentarios para ser usados como ingredientes en la fabricación o preparación de comestibles. [Véase Anexo V]

Esta directiva divide los aditivos alimentarios en 24 categorías de acuerdo con su funcionalidad (ej. antioxidantes, conservantes, colorantes, emulsificantes, humectantes) y lista un número de sustancias excluidas de la directiva, incluido procesamiento, nutrientes, saborizantes y productos agroquímicos.

La Directiva marco también libra la siguiente definición de “aditivo alimentario”: “cualquier sustancia que normalmente no es consumida como alimento en sí mismo y normalmente no utilizada como ingrediente alimentario, tanto si tiene valor nutritivo como si no La adición intencionada al alimento es para un propósito tecnológico en la fabricación, procesado, preparación, tratamiento, empaquetado, transporte o almacenado para que dé un resultado en el alimento, o razonablemente esperado a que resulte, en él o en su subproducto siendo directa o indirectamente un componente de dicho alimento”.

Antes de que el uso de un aditivo sea aceptado para la alimentación es necesario determinar por pruebas toxicológicas si la sustancia se ajusta a los niveles de seguridad deseados para su uso como aditivo. Una vez que la necesidad tecnológica y la valoración para el consumo de los

aditivos se han establecido, se necesita conocer las implicaciones sanitarias del uso de los mismos.

A partir de la dosis más elevada que no haya producido efectos adversos en el animal, se fija el factor de inocuidad y con esos datos se establece la *Ingesta Diaria Admisible (IDA)*. La IDA se define como cantidad media de la sustancia que puede ingerirse diariamente a través de la dieta, aun durante toda la vida sin riesgos detectables, tomando en consideración todos los factores conocidos hasta el momento de la evaluación. Se expresa en mg de sustancia ingeridos por Kg de peso corporal y por día, ya que es evidente que cuanto mayor sea el organismo tanto mayor será la posibilidad de dilución de la sustancia potencialmente nociva, así como la capacidad para destruirla o expulsarla.

Concentraciones altas de vitamina A dan como resultado la decoloración amarillenta de la piel por toxicidad.

La Directiva de Colores de la Unión Europea lista los colorantes y considera el que es apto para uso alimentario y especifica los límites de impurezas. El Comité Científico de los Alimentos (SCF, por sus siglas en inglés) recomienda que aquellos colorantes cuyo índice máximo de ingesta diaria (ADI) no esté especificado, no se permita en los alimentos. Aunque se hace una excepción para aquellos colorantes que normalmente se encuentran presentes en los alimentos y para aquellas situaciones en que el consumo normal no exceda la cantidad de colorantes que normalmente se encuentran presentes en los alimentos. Esta interpretación presta apoyo a la categorización de colorante *natural* vs. *Sintético*. Ya que cada país puede modificar la directiva de acuerdo con su propia agenda, no es de extrañar que haya algunas diferencias en la interpretación del concepto “natural”. Italia es, probablemente el país más restrictivo de la Unión Europea. Noruega no permite ningún colorante sintético y permite colorantes naturales sólo en cantidades que considera tecnológicamente necesarias, aunque no haya límites especificados. Cada colorante se especifica con un número E [27].

La legislación española es muy restrictiva en cuanto al uso, la elección y las condiciones de utilización de los colorantes alimentarios y se adapta a la perfección a la normativa de los países de la UE y del resto del mundo.

Los colorantes usados en alimentación deben estar identificados con su nombre FD&C (food, drug and cosmetic) pero los colorantes usados para otros propósitos industriales pueden referirse con su nombre común. En este caso quien manda es su certificación.

Para clasificar los colorantes más en profundidad, la Sociedad de Pigmentos y Coloristas en Inglaterra y la Asociación Americana De Químicos Textiles y Coloristas de los Estados Unidos, desarrollaron un sistema del índice de color (CI). A cada colorante se le da un número CI. Los colorantes también se identifican con su número de código de Registro CAS (Chemical Abstract Service).

10. PERSPECTIVA DE FUTURO

La preferencia por los colorantes naturales por encima de los sintéticos empieza con el movimiento verde de los años 60 y parece no mostrar signos de decrecimiento.

Existen dos tendencias de consumo que han impulsado un fuerte desarrollo en el campo de los aditivos alimentarios, como son la creciente preferencia de los consumidores por los productos naturales, y el cambio en los hábitos alimenticios de las familias, asociado principalmente con el aumento en la proporción de mujeres que trabajan fuera del hogar, que ha acrecentado la demanda de alimentos preparados.

Se estima que la presión de los consumidores forzará a la industria de alimentos a utilizar una mayor proporción de ingredientes naturales en el futuro, a pesar que éstos son menos estables y más caros que los sintéticos. Entre las ventajas de los aditivos alimentarios naturales en comparación con los sintéticos están: la composición y atributos sensoriales de los productos naturales son demasiado complejos como para ser imitados por una combinación de productos sintéticos; las sustancias a menudo no pueden sintetizarse químicamente a un precio competitivo: se requiere el uso obligado de productos naturales para la manufactura de algunos alimentos.

Un factor importante es el coste de los estudios toxicológicos que se ven envueltos en la aprobación de un nuevo colorante.

Un interés considerable en la investigación se ha demostrado en la biotecnología de los colorantes alimentarios, particularmente en la producción de colorantes existentes con un mercado predecible. Los productos biotecnológicos tendrán que competir con los suministros de la agricultura tradicional en términos económicos y de calidad. Una ventaja de la biotecnología es la seguridad de un suministro dependiente no sujeto a las extravagancias de política o clima.

10.1. Últimas novedades, noticias, investigaciones...

La comunidad científica siempre ha mantenido reservas respecto a los colorantes artificiales.

Entrevista a Ruperto Bermejo, experto en colorantes alimentarios, junto con otros investigadores trabajan en el desarrollo de nuevos colorantes naturales obtenidos de microalgas, como el colorante rosa de la proteína β -ficoeritrina de la alga *Porphyridium cruentum* que puede ser usado para batidos de fresa, yogures, etc.

Estos investigadores continúan buscando más colorantes naturales ya que la mayoría son sintéticos y no los ven demasiado buenos. El problema de los colorantes naturales es que son de elevado coste y difíciles de extraer, pero el organismo no los toma como algo extraño. Eso no quiere decir que los sintéticos sean tóxicos, ya que superan las pruebas realizadas.

Solo está patentado la extracción y purificación ahora faltaría que las empresas investigaran si tiñe o no el colorante. Se continúa investigando más microalgas.

9 de febrero de 2007 [en línea]

<<http://www.consumaseguridad.com/sociedad-y-consumo/2007/02/09/26680.php>>

Uso del licopeno como colorante alimentario

La Comisión ha solicitado al Grupo de Expertos en Aditivos Alimentarios, Aromas, Coadyuvantes y Materiales en contacto con Alimentos un dictamen científico sobre la seguridad del uso de licopeno sintético como colorante alimentario en las categorías de alimentos especificadas en el expediente correspondiente, también debía evaluar la seguridad del uso de licopeno de *Blakeslea trispora* como colorante alimentario en las categorías de alimentos y niveles de uso propuestos al expediente.

El Grupo decidió realizar una evaluación de la seguridad del licopeno de todas las fuentes. Así, en este dictamen, el Grupo evalúa la seguridad del uso de licopeno de diferentes fuentes como colorante alimentario.

Los resultados indican que el licopeno sintético o el extracto del tomate es biodisponible. Se llega a la conclusión que el uso de licopeno como colorante alimentario aumenta considerablemente la ingesta de licopeno.

La ingesta de licopeno a partir de fuentes naturales y de colorantes alimentarios se mantuviera dentro de la IDA de 0,5 mg/kg de peso corporal por día, excepto para niños.

8 de abril de 2008 [en línea]

<<http://www.gencat.net/salut/acsa/Du12/html/es/dir1592/doc17035.html>>

Natural tomato extract “helps protect skin from within”

Investigadores británicos han descubierto que un extracto del tomate puede proteger la piel contra el daño solar y el envejecimiento celular.

En un nuevo estudio de las universidades de Newcastle y Manchester se encontró que las personas que consumieron 5 cucharadas de pasta de tomate rica en licopeno cada día durante 12 semanas tuvieron un 33% más de protección contra el sol.

Además, aquéllos que complementaron su dieta con la pasta de tomate tuvieron niveles más altos de pro-colágeno en su piel, una carencia que conduce a signos de envejecimiento.

El profesor co-investigador Lesley Rhodes dijo a la Sociedad Británica para la Investigación Dermatológica en el congreso anual: “la dieta de tomate ayuda a los niveles de pro-colágeno en la piel significativamente. Estos incrementos hacen pensar en una inversión potencial del proceso del envejecimiento de la piel. Esto significa además, una reducción en las quemaduras de sol”.

Un potente antioxidante, el licopeno defiende de forma natural el cuerpo de los radicales libres, con dos o tres veces más potencia que el beta caroteno.

13 Mayo 2008

<<http://www.lookinggood-feelinggreat.co.uk/LatestNews/bsp/Natural-tomato-extract-helps-protect-skin-from-within-/tabid/54/articleID/18591071/Default.aspx>>

Los tomates deshidratados eliminarían los tumores prostáticos

Un estudio indica que se podrá eliminar el cáncer prostático a partir de los tomates deshidratados. Un nuevo estudio sugiere que el procesamiento del tomate sería el factor clave para la eliminación de los tumores.

Se vio que un carbohidrato llamado FruHis, protegió a un conjunto de ratas con tumores prostáticos, para ello los investigadores rehidrataron los tomates para crear una pasta con alto contenido de FruHis.

Según el doctor Valeri V, de la Universidad de Missouri en Colombia, se podrán desarrollar nuevas terapias menos tóxicas, para la eliminación del cáncer.

El equipo de Mossine realizó un estudio a ratas, se dividieron en grupos, a cada grupo se las alimento de una manera diferente, el grupo de ratas que comió la pasta de tomate con elevado contenido de FruHis vivieron más tiempo que las que no lo comieron.

El FruHis actúa de 2 maneras, la primera como antioxidante y segundo se combina con el licopeno y logra eliminar las células tumorales en la próstata. Así que inhibe la aparición de cáncer y luego frena su crecimiento.

Todavía es pronto para utilizarlo para prevenir el cáncer ya que primero faltaría un estudio con humanos.

10 de junio de 2008 [en línea]

<http://www.buenasalud.com/news/index.cfm?news_id=14234&mode=browse>

Pond's White Beauty helps Women get pinkish white glow

El último deseo entre las mujeres es una piel saludable con una luz de tono rosada. La nueva gama de Pond's White Beauty que lidera la marca internacional POND'S ha utilizado un potente antioxidante, el licopeno, junto con Provitamina B3, para devolver a la piel un brillo blanco rosado.

Venkat Sridhar, director general dice: “sólo con iluminar la piel no es suficiente para la mujer moderna para sentirse bella. Introduciendo licopeno a nuestra Provitamina B3 en nuestro producto, estamos dando a la mujer exactamente lo que necesita para la salud de su piel, que la hace verse mucho más guapa. El licopeno se encuentra de forma natural en la piel, y una piel rosada por fuera significa una piel saludable por dentro”.

La nueva Pond's White Beauty es la primera crema que incluye licopeno en la India, el potente antioxidante es muy conocido en U.S.A. y Europa por sus beneficios para la salud y se usa realmente en muchos suplementos alimentarios y productos nutracéuticos.

El licopeno es un antioxidante natural que se da en frutas y verduras como la guayaba, tomate, sandía, y que les da el color rosa o rojo.

No obstante, menos del 1% de los antioxidantes consumidos oralmente a través de estas frutas y verduras alcanzan la piel. La nueva Ponds White Beauty con licopeno + Provitamina B3 es la más fácil, rápida y efectiva manera de conseguir una complexión atractiva rosada.

Con el lanzamiento de Pond's White Beauty la marca ha reforzado su compromiso para proporcionar soluciones del cuidado facial a las mujeres indias que están al margen de la tecnología y apoyadas por un extenso R&D.

La gama Pond's White Beauty está actualmente disponible por toda India. Eso incluye todos los productos que contienen licopeno + Provitamina B3.

17 Junio 2008 (India)

<http://www.fibre2fashion.com/news/fashion-news/newsdetails.aspx?news_id=58273&page=1>

Colores que alimentan

Entrevista realizada por Esperanza Fuentes a Francisco Javier Heredia, responsable del grupo Color y Calidad de los Alimentos.

Lo que no sabemos es que al mismo tiempo que elegimos el color estamos eligiendo una serie de nutrientes que dependen de él. El grupo Color y Calidad de los Alimentos de la Universidad de Sevilla investiga precisamente esto: el estudio del color y todos los factores que le afectan. “Los pigmentos no sólo aportan color, sino que son compuestos biofuncionales que determinan el estado de un alimento”, precisa el investigador Francisco Javier Heredia. Entre sus estudios más destacados se encuentran los relacionados con la nutrición. Más bonitas, coloridas y, en ocasiones, más saludables. El grupo Color y Calidad de los Alimentos ha determinado, a través de sus investigaciones que, en muchos alimentos, la intensidad del color es indicativo de su estado y de las propiedades nutritivas que posea.

Es el caso de las naranjas. Cuanto más intenso sea el color de esta fruta, “más carotenoides posee, y más provitamina A”, que es buena para la vista y las defensas entre otras propiedades. Lo mismo le ocurre a los tomates: “Cuanto más rojos, más licopeno”, que tiene propiedades antioxidantes. Normalmente, explica Heredia, “una determinada intensidad de color está relacionada con la calidad biofuncional”.

Se trata de una metodología que actúa como un “ojo mecánico” que evalúa objetivamente el color de un alimento, “sin los condicionantes de iluminación, cansancio, etc., del ojo humano”. Se trata de la colorimetría triestímulo y sirve, según explica el científico, para, por ejemplo, “que una fábrica de zumos de tomate y tomate envasado, pueda separar de forma mecánica los tomates para un uso u otro: los rojos para zumos, los verde para el envasado”. Tecnología “cien por cien española” que sitúa a Andalucía a la cabeza de la investigación en el sector agroalimentario.

18 Junio 2008

<http://www.andaluciainvestiga.com/espanol/noticias/3/coloralimento_6514.asp>

11. CONCLUSIONES

Incuestionablemente el color influye en otras características sensoriales, y a su vez, a la aceptación del alimento, la elección y la preferencia. No obstante, su efecto parece ser el resultado de una asociación adquirida más que una característica inherente psicofísica.

Durante los últimos 30 años, la dieta –paradigma de la salud– de ser los alimentos la fuente esencial de los nutrientes para mantener la vida y el desarrollo, ha experimentado gradualmente con los productos de alimentación un reconocimiento como fuente para la gestión o prevención de enfermedades. Los cambios de paradigma se deben en parte a las pruebas epidemiológicas que asocian dietas ricas en frutas y verduras con la reducción del riesgo de desarrollo de ciertos tipos de cáncer y otras enfermedades crónicas. El licopeno, objeto del estudio de este proyecto, anteriormente discutido, está entre un gran número de componentes en frutas y verduras que son potencialmente responsables de esta relación.

Las propiedades físicas y químicas de un carotenoide están influenciadas por interacciones con otras moléculas en su inmediato entorno molecular, como lípidos y proteínas. Complementario a esto, el carotenoide puede influir a las otras moléculas de su entorno y la estructura y propiedades de la matriz (ej. membrana) donde se localiza. Entender estas interacciones y sus efectos es la principal parte de entender cómo funcionan y actúan los carotenoides en vivo y nos demuestra la importancia y el difícil desafío de la química de los carotenoides de hoy.

Los datos que conciernen a la biodisponibilidad del licopeno, la distribución de los tejidos, metabolismo, excreción y las acciones biológicas experimentales con animales y humanos aumentan; no obstante, es necesaria mucha más investigación en este campo ya que las especies animales todavía no poseen un modelo adecuado para estudiar todos los aspectos de la biocinética de los carotenoides en los humanos.

Los resultados de estudios con primates no humanos son prometedores, pero se necesitan más estudios para evaluar estos modelos. Se pueden considerar otros aspectos para la investigación de aspectos específicos de la biocinética de los carotenos, como es su metabolismo.

A escala industrial, la extracción del licopeno y la purificación con la mínima pérdida de bioactividad es lo deseable para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Los productos de licopeno de alta calidad que se ciñen a las regulaciones de seguridad alimentaria podrán ofrecer beneficios potenciales a la industria de la alimentación.

Obviamente, es necesario un estudio más extenso para descubrir su modo de acción y para entender mejor el alcance de su efectividad.

La aplicación comercial exitosa de la extracción con fluidos supercríticos demanda un trabajo intensivo de investigación básica y desarrollo puesto que, a diferencia de las técnicas convencionales de extracción, la extracción supercrítica (ESC) no es una tecnología madura y de aplicación directa a cualquier producto.

Si el alimento tiene que ser realmente parte del mercado global, entonces es importante que los aditivos alimentarios sean fabricados con el mismo criterio en todos los países. De ahí que la armonización de las especificaciones del colorante y el uso tiene que ser un objetivo importante. Hay muchos temas no tratados, y por tanto es esencial que los fabricantes de colorantes coordinen sus esfuerzos para validar y estandarizar los métodos y también trabajar estrechamente con la industria alimentaria y los cuerpos reguladores para asegurar que los consumidores continúen recibiendo productos alimenticios que son seguros y atractivos.

Referente al proceso de obtención del licopeno en el laboratorio, hay que tener en cuenta que las muestras de licopeno se han cubierto con material opaco tanto como con papel de aluminio o un trapo oscuro para que no les afectara la luz. Se colocaron en material topacio y se guardaron a cierta temperatura para conservarlas en buen estado antes de sus análisis.

Se ha intentado recuperar el hexano, que es el disolvente en el que se encuentran disueltos los carotenoides. La operación usada fue la de condensación de dicho solvente desde el refrigerante del sistema, en este caso, el rotavapor. Se concluye que la cantidad recuperada de disolvente fue pequeña debido al propio sistema (refrigerante demasiado grande o pérdidas por evaporación).

En la cromatografía de capa fina se ha observado que el tomate de rama y el cherry son los que más se parecen al patrón de licopeno, pero eso no descarta que los otros no sean licopeno, ya que la lectura del espectrofotómetro UV-vis mostraba el espectro del licopeno, teniendo en cuenta las referencias bibliográficas.

Como resultado final hay que decir que, el tomate que contiene más cantidad de licopeno es el tomate triturado. Cabe destacar que de los 6 tipos de tomate que se analizaron, el triturado es el único en el que la extracción ha sido más selectiva y completa. Esto puede ser debido a que entre el contacto con la acetona y la muestra existía más transferencia de masa o porque existan añadidos artificiales a los productos preparados, y por eso se obtuvo más concentración. Si valoramos sólo los tomates vegetales, sin añadidos, el que contiene más concentración de licopeno es el de variedad de pera seguido del de rama y por último el cherry.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abbott, D.; Andrews, R.S.; *Introducción a la cromatografía*. 2ª ed. Madrid: Alhambra, 1970.
- [2] Antibióticos, S.A.U. *Procedimiento para la obtención de licopeno*. España, patente de invención, ES2157166A1. 01-08-2001.
- [3] Arias, R.; Tung-Ching L.; Logendra, L.; Janes, H. Correlation of Lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* colour readings of a Hydrohonic tomato and the relationship of maturity with color and Lycopene content. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 2000, vol. 48, p. 1697-1702.
- [4] Baysal, E.; Ersus, S.; Starmans, D.A. Supercritical CO₂ Extraction of β -carotene and Lycopene from Tomato Paste Waste. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 2000, Vol. 48, p. 5507-5511.
- [5] Boscarol, M. *Colorimetría: Teoría del color*. [en línea]. [Consulta: 25 Marzo 2008]. Disponible en: <http://www.gusgsm.com/categoria_teoría_del_color>.
- [6] Botella-Pavía, P.; Rodríguez-Concepción, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, 2006, vol. 126, p. 369-381.
- [7] Britton, G. Carotenoids. [mensaje en línea]. 23 Enero 2008. Comunicación personal.
- [8] Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 1995, vol.9, p. 1551-1558.
- [9] Britton, G. *The carotenoids page*. [en línea]. [Consulta: 15 Noviembre 2007]. Disponible en: <<http://dcb-carot.unibe.ch/carotint.htm>>.
- [10] Britton, G. TLC of carotenoids. A: Waksmundzka-Hajnos, M.; Sherma, J.; Kowalska, T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Boca Raton: CRC Press, 2008, Capítulo 21 p.543-577.
- [11] Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids : handbook*. Basel: Birkhäuser, 2004. ISBN 3764361808.
- [12] Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids. Vol 1A: Isolation and Analysis* Basel: Birkhäuser, 1995. ISBN 3764329106.
- [13] Britton, G.; Young, A.J. *Carotenoids in photosynthesis*. London: Chapman & Hall, 1993.
- [14] Calana González, C.E. *Aditivos alimentarios: colorantes y pigmentos* [en línea]. [Consulta: 10 Enero 2008]. Disponible en:

- <<http://www.monografias.com/trabajos41/aditivos-alimentarios/aditivos-alimentarios2.shtml>>.
- [15] Capilla, P.; Artigas, J.M.; Pujol, J. *Fundamentos de colorimetría*. Valencia: Universitat de València, 2002. ISBN 8437054206.
- [16] Cardona Villa, E.M. Licopeno [mensaje en línea]. 21 enero 2008. Comunicación personal.
- [17] Cardona, E.M.; Ríos, L.A.; Restrepo, G.M. Extracción del carotenoide licopeno del tomate chonto (*Lycopersicum esculentum*). *Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica*, 2006, vol. 13, num.2, p. 44-53.
- [18] Carotenoids workshop. Practical work. Burapha University, Marzo 2006. Acta de congreso: 16 hojas.
- [19] Choudhari, S.M.; Ananthanarayan, L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry*, 2007, Vol. 102, p. 77-81.
- [20] Consejo superior de investigaciones científicas (CSIC). Extracción fraccionada de carotenoides de fuentes naturales con alto contenido en licopeno mediante fluidos supercríticos. España, patente de invención, ES2003000262. 30-05-2003.
- [21] Consejo superior de investigaciones científicas (CSIC). Extracción con fluidos supercríticos y fraccionamiento selectivo de licopeno y otros carotenoides a partir de fuentes naturales. España, solicitud de patente, CSIC AGRO017. 06-06-2002.
- [22] Del Valle, J.M.; Aguilera, J.M. Revisión: Extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos. *Food Science and Technology International*, Febrero 1999, vol. 5, p. 1-24.
- [23] Druding, S.C. *Dye History from 2600 BC to the 20th Century*. [en línea]. Washington, 1992. [Consulta: 26 marzo 2008]. Disponible en: <<http://www.straw.com/sig/dyehist.html>>.
- [24] Durán, A. *Los aditivos y colorantes en los alimentos*. [en línea]. [Consulta: 9 octubre 2007]. Disponible en: <<http://www.teletica.com/archivo/buendia/noticias/2005/05/aditivos.htm>>.
- [25] Felipe, A. Aplicaciones del color en la tecnología de alimentos. A: (coords) Artigas, J.M.; Capilla, P.; Pujol, J. *Tecnología del color*. Valencia: ed. Universitat de València, 2002, p. 329-338.
- [26] Fernández San Juan, P.M. *Aditivos alimentarios: evaluación de la inocuidad, clasificación y funciones tecnológicas*. [en línea]. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de salud Carlos III. [Consulta: 3 octubre 2007]. Disponible en: <http://www.unav.es/farmacia/graduados/aditivos_alimentarios.htm>.

- [27] Francis, F.J. (ed). *Colorants. Practical guides for the food industry*. Minnesota: Eagan Press, 1999.
- [28] Garcia i Vilaseca, M. Colorants: ús i abús (estudi dels colorants en les l·laminadures). Tutora: Dorca Llavina, M. Treball de recerca, 14-12-2004.
- [29] González de Diego, A.; Romera Ramos, L. Obtención de aceite esencial de limón para perfumería. Proyecto Final de Carrera, UPC, Departamento de Ingeniería Química, 2007 [Biblioteca EPSEVG].
- [30] Guri Baiget, S.; Torres Sanglas, J. Bibliografía licopeno [mensaje en línea]. 10 Junio 2008. Comunicación personal.
- [31] Hawley. *Diccionario de química y de productos químicos*. Revisado por Irving Sax, N.; Lewis, R.J. Barcelona: Omega, 1992. ISBN 8428208913.
- [32] IARC (International Agency for Research on Cancer) handbooks of Cancer Prevention. *Carotenoids*. Lyon, 1998.
- [33] Indena, S.p.A. *Procedimiento de extracción de licopeno*. Italia, patente de invención, ITMI961442. 16-01-1998.
- [34] Lauro, G. J.; Francis, F. J. (ed). *Natural Food colorants: science and Technology*. New York: Marcel Dekker, 2000. ISBN 0824704215.
- [35] Lozano, M. [et al.]. *Contenido en carotenoides (licopeno y β -caroteno) en concentrado de tomate a lo largo de la campaña*. [en línea]. Badajoz: INTAEX, 2004 [Consulta: 15 Febrero 2008]. Disponible en: <<http://www.horticom.com/pd/imagenes/56/368/56368.html>>.
- [36] Lycored Natural Products Industries Ltd. *Procesamiento industrial de tomates y extracción de licopeno*. Israel, patente de invención, IL11869796. 03-06-1998.
- [37] Martín, A. [et al.]. Co-precipitation of carotenoids and bio-polymers with the supercritical anti-solvent process. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007, vol. 41, p. 138-147.
- [38] Martínez de la Ossa, E.; Galán Serrano, M.A. *Extracción con fluidos supercríticos: fundamentos*. *Ingeniería química*, Julio 1990, p. 169-175.
- [39] Martínez de la Ossa, E.; Galán Serrano, M.A. Extracción con fluidos supercríticos: termodinámica del equilibrio de fases. *Ingeniería química*, Agosto 1990, p. 125-131.
- [40] Martínez Martínez, A. *Carotenoides*. [en línea]. Facultad de Química farmacéutica. Medellín: Universidad de Antioquia, 2003 [Consulta: 17 Marzo 2008]. Disponible en: <<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/carotenoides2001.pdf>>.
- [41] Meléndez-Martínez, A.J.; Britton, G. [et al.]. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, 2007, vol. 101, p. 1145-1150.

- [42] Meléndez-Martínez, A.J.; Britton, G. [et al]. Color and carotenoid profile of Spanish Valencia late ultrafrozen orange juices. *Food Research International*, 2005, vol. 38, p. 931-936.
- [43] Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2004, vol. 54, núm. 11.
- [44] Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2004, vol. 54, núm. 3.
- [45] Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2007, vol. 57, núm. 2.
- [46] Mínguez Mosquera, M. I. [et al.]. *Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos*. Sevilla: Universidad de Sevilla, 1997.
- [47] Ministerio de trabajo e inmigración. *Fichas Internacionales Seguridad Química FISQ*. [en línea]. [Consulta: 15 Abril 2008] Disponible en: <<http://empleo.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspnsyna.htm>>.
- [48] Olempska-Beer, Z. *Lycopene (synthetic): chemical and technical assessment (CTA)*. [en línea]: Office of Food Additive safety, Center of Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. College Park, Maryland, USA. [Consulta: 8 Abril 2008] Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/cta_lycopene.pdf>.
- [49] Olivé Duran, J. Análisi instrumental. Asignatura impartida en la E.P.S.E.V.G. por la Universidad Politècnica de Catalunya. Vilanova i la Geltrú, 2004.
- [50] Ollanketo, M. [et al.]. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene in tomato skins. *European Food Research Technology*, 2001, Vol. 212, p. 651-665.
- [51] Park, P.K.; Kim, E.Y.; Chu, K.H. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*, 2007, vol. 53, p.148-152.
- [52] Pavia, D.L.; Lampman, G. M.; Kriz, G.S.; Food Colors. A: Pavia, D.L.; Lampman, G. M.; Kriz, G.S. *Organic Laboratory Techniques*. 3ª edición. Washington: Saunders College publishing, 1988, p.273-280.
- [53] Quiminet. *Ingredientes y colorantes en los alimentos*. [en línea]. Internacional Food Information Council Foundation, 22.05.2006. [Consulta: 19 octubre 2007]. Disponible en: <http://quiminet.com/ar4/ar_G%2594%25F5VhOrO.htm>.
- [54] Raventós Santamaría, M. Extracció amb fluids supercrítics. A: Raventós Santamaría, M. *Indústria alimentària: tecnologies emergents*. Barcelona: Edicions UPC, 2003, p. 131-166.

- [55] Raventós, M.; Duarte, S.; Alarcón, R. Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview. *Food Science and Technology International*, 2002, vol. 8, p.269-284.
- [56] Rodríguez-Amaya, D.B. *A Guide to carotenoid analysis in foods*. Washington: OMNI Research, 2001. ISBN 1578810728.
- [57] Rodríguez-Amaya, D.B. Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in prepared, Processed, and Stored Foods. Campinas: OMNI Project, 1997.
- [58] Roldán-Gutiérrez, J.M.; Luque de Castro, M.D. Lycopene: the need for better methods for characterization and determination. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, vol. 26, núm. 2, p.163-170.
- [59] Rozzi, N.L. [et al.]. Supercritical Fluid Extraction of Lycopene from Tomato Processing Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50 p. 2638-2643.
- [60] Schoefs, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products: Properties of the pigments and methods of analysis. *Food Science & Technology*, 2002, vol. 13, p. 361-371.
- [61] Schoefs, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products: A practical case-by-case view. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, vol.22, núm. 6, p. 335-339.
- [62] Schoefs, B. Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1054, p.217-226.
- [63] Torrents Gómez, A. Óptica fisiológica II: visión cromática. Asignatura impartida en la E.U.O.O.T. por la Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, 2000.
- [64] U.S. Food and Drug Administration. *Aditivos en los Alimentos*. [en línea]. Centro de Seguridad de Alimentos y Nutrición Aplicada. Consejo Internacional de Información de Alimentos, Estados Unidos: Enero 1992 [Consulta: 6 septiembre 2007]. Actualización anual. Disponible en: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/sfoodadd.html>>.
- [65] Valderrama, M. Colorantes alimentarios. [en línea]. *En buenas manos: salud y terapias naturales*. [Consulta: 12 Noviembre 2007]. Disponible en: <<http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=1277>>.
- [66] Wageningen University. *Colorantes*. [En línea]. [Consulta: 2 Octubre 2007]. Netherlands, actualización mensual. Disponible en: <<http://www.food-info.net/es/caro/intro.htm>>.

13. GLOSARIO

Aditivo: Término no específico o que se aplica a cualquier sustancia añadida a un materia de base pequeñas concentraciones con un pósito definido.

Antioxidante: Compuesto orgánico que se añade para retardar la oxidación, deterioro y enranciamiento. Los antioxidantes alimenticios son efectivos en muy pequeñas concentraciones, y no sólo retardan el enranciamiento sino que protegen el valor de nutrición por disminución de la descomposición de las vitaminas y ácidos de las grasa esenciales.

Cloroplastos: Son los orgánulos celulares que en los organismos eucariontes fotosintetizadores se ocupan de la fotosíntesis.

Colorante: Cualquier sustancia que imparta color a otro material o mezcla. Son tanto tintes como pigmentos.

Comóforo: Es la parte o conjunto de átomos de una molécula responsable de su color.

Cromoplastos: Los Cromoplastos son un tipo de plastos, orgánulos propios de la célula vegetal, que almacenan los pigmentos a los que se deben los colores, anaranjados o rojos, de flores, raíces o frutos. Cuando son rojos se denominan rodoplastos. Los cromoplastos que sintetizan la clorofila reciben el nombre de cloroplastos.

Enlace doble: Es el fenómeno químico mediante el cual dos átomos se unen compartiendo una o varias parejas de electrones; por lo tanto, no pierden ni ganan electrones, sino que los comparten.

Isomería: Fenómeno que presentan ciertos compuestos, consistente en el hecho de tener la misma composición centesimal, el mismo peso molecular y la misma fórmula empírica, pero propiedades físicas y químicas diferentes.

Isomerización: Proceso de reordenación interna de los átomos de una molécula para obtener un isómero.

Isómero: Dicho de dos o más compuestos que presentan isomería.

Pigmento: Cualquier sustancia, generalmente en forma de polvo seco, que da color a una sustancia o a una mezcla. La mayoría de los pigmentos son insolubles en disolventes orgánicos y agua.

Polieno: Cualquier compuesto alifático o alicíclico insaturado que contenga más de cuatro átomos de carbono en la cadena y que tenga como mínimo dos dobles enlaces.

Radical libre: Un fragmento molecular que tiene uno o más electrones desapareados, generalmente de vida media corta y muy reactivo. Los radicales libres están formados solamente por la rotura de un enlace molecular.

Triglicéridos: Son los principales constituyentes de las grasas y aceites; son ésteres naturales de los ácidos grasos y glicerina; tiene la fórmula general: $\text{CH}_2(\text{OOCR}_1)\text{CH}(\text{OOCR}_2)\text{CH}_2(\text{OOCR}_3)$ en donde R_1 , R_2 y R_3 son generalmente de distinta longitud de cadena.

14. ANEXOS